

UNTERSUCHUNGEN ZUR
ELEKTROPHORETISCHEN DIFFERENZIERUNG
DES GENOMS VON HUMANEN ROTAVIREN

Reinhard Büttner

München

1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554612_0008

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut
für Hygiene der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. F. Deinhardt

UNTERSUCHUNGEN ZUR ELEKTROPHORETISCHEN DIFFERENZIERUNG
DES GENOMS VON HUMANEN ROTAVIREN

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
Reinhard Büttner
geb. am 15.1.1960 in Fulda

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. G. Frösner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Deinhardt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.1986

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Frösner bin ich zu größtem Dank für die Vergabe des Themas und die intensive Betreuung bei der Bearbeitung verpflichtet.

In gleicher Weise hat mich Herr Prof. Dr. H. Wolf und seine ganze Arbeitsgruppe hervorragend und kollegial unterstützt. Insbesondere Herrn Dr. R. Seibl danke ich für die vielfältigen methodischen Hinweise.

Desweiteren schulde ich Herrn Dr. B. Haas, Max-Planck-Institut für Biochemie, Fürstenried, und Herrn Prof. Dr. G.F. Kahl sowie Dr. H. Foth, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, Dank für wertvolle Hilfen und Anregungen.

Vorbemerkung

zur angestrebten Arbeitsweise:

"Aber der Wahrheit näher zu kommen ist nicht leicht. Es gibt nur einen Weg, den Weg durch unsere Irrtümer. Nur aus unseren Irrtümern können wir lernen; und nur der wird lernen, der bereit ist, die Irrtümer anderer als Schritte zur Wahrheit zu schätzen; und der nach seinen eigenen Irrtümern sucht, um sich von ihnen zu befreien.

Die Idee der Selbstbefreiung durch das Wissen ist also nicht etwa dasselbe wie die Idee der Naturbeherrschung. Es ist vielmehr die Idee der geistigen Selbstbefreiung vom Irrtum, vom Irrglauben. Es ist die Idee einer geistigen Selbstbefreiung durch die Kritik an den eigenen Ideen."

Karl Raimund Popper 1984

In diesem Sinne sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur als vorläufig zu betrachten und sollen der Kritik ausgesetzt werden.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	EINLEITUNG	1
	1. Entdeckung der Rotaviren	1
	2. Das Rotavirusgenom	2
	3. Zusammenhang zwischen Serotypen und Elektropherotypen	4
	4. Epidemiologische Daten	6
	5. Klinische Daten	8
	6. Diagnostik	11
	7. Rekombinanten	13
II.	ZIEL DER ARBEIT	14
III.	MATERIAL UND METHODEN	16
	A. RNA-Extraktion	16
	1. Extraktion aus gereinigten Viren	16
	2. Direktextraktion	18
	B. Gelsysteme	
	1. Harnstoff-Agarose-Gel	19
	2. Polyacrylamid-Agarose-Gel	20
	3. Reines Polyacrylamid-Gel	22
	C. Färbungen	23
	1. Ethidiumbromidfärbung	23
	2. Silberfärbung mit Natriumborhydrid	23
	3. Silberfärbung mit Kaliumdichromat	24
	4. Silberfärbung mit Benzotriazol	24
D.	KLASSIFIZIERUNG DER ELEKTROPHEROTYPEN	26
E.	RNA-ENDMARKIERUNG	27
	1. 5'-Endmarkierung mit ³² ATP und PNK	27

2. 3'-Endmarkierung mit 32 pCp und T ₄ -RNA-Ligase	31
a. McCrae 1981	31
b. England et al. 1980	31
IV. ERGEBNISSE	34
A. Vergleich der Extraktionsmethoden	34
1. Mit Polyacrylamidgelen	34
2. Mit Absorptionsspektren	35
B. Vergleich der Gelsysteme	37
C. Vergleich der Färbungen	40
1. Ethidiumbromid im Vergleich zu Silber mit Natriumborhydrid	40
2. Natriumborhydrid im Vergleich zu Kaliumdichromat	42
3. Natriumborhydrid im Vergleich zu Benzotriazol	43
D. Übersicht der Elektropherotypen	44
E. Ergebnisse der Endmarkierungen	46
1. 5'-Endmarkierung	46
2. 3'-Endmarkierung	48
a. McCrae 1981	
b. England et al. 1980	50
V. DISKUSSION	
1. Prüfung der Methoden zur RNA-Extraktion	55
2. Prüfung der Gelsysteme	56
3. Vergleich der Färbemethoden	57

	<u>Seite</u>
4. Epidemiologische Auswertung der Elektropherotypen	50
5. Radioaktive Endmarkierung	62
VI. ZUSAMMENFASSUNG	64
VII. LITERATUR	66

Abkürzungen:

DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonucleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonucleinsäure
RV	Rotavirus
HRV	humanes Rotavirus
RV-RNA	rotavirale Ribonucleinsäure
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
EM	Elektronenmikroskopie
PAA	Polyacrylamid
³² ATP	³² Phosphor markiertes Adenosin-5'-triphosphat
³² pCp	³² Phosphor markiertes Cytidin 3',5'-Bis-Phosphat
PNK	Polynukleotidkinase
AP	Alkalische Phosphatase
IAHA	Immun-Adhärenz-Hämagglutinationstest
SDS	Natriumdodecylsulfat

I. EINLEITUNG

1. Entdeckung der Rotaviren

1943 und 1949 veröffentlichten Light und Hodes Berichte über die erfolgreiche Übertragung akuter Gastroenteritiden mit Hilfe bakterienfreier Stuhlfiltrate von Kindern auf neugeborene Kälber. In tiefgefrorenen Proben desselben Filtrates liessen sich später elektronenmikroskopisch Rotaviren nachweisen (Hodes, 1977).

In einer ähnlichen Versuchsreihe konnten Mebus et al., 1969 durch die Verfütterung fäkalhaltigen Materials an muttermilchfrei aufgezogene Kälber Durchfälle hervorrufen. Dagegen verursachte die Inokulation von aus dem Fäzes kultivierten Bakterien keine Krankheitserscheinungen. Der endgültige Nachweis von Viren der typischen Rotavirus-Morphologie gelingt 1973 elektronenmikroskopisch. Unabhängig voneinander veröffentlichten Bishop et al. 1973 und 1974 und Flewett et al. 1973 darüber Berichte.

Zunächst noch als "reovirus-like" beschrieben, zeigen Middleton et al., 1974 und Flewett et al., 1974, daß diese Partikel morphologisch eindeutig von Reoviren und Orbiviren zu unterscheiden sind, so daß Flewett 1974 den Namen Rotaviren prägt. Dieser Name beschreibt das radspeichenartige Bild der Viren im Elektronenmikroskop. Die Abb. 1 zeigt den Kern, speichenartig angeordnete Kapsomere sowie eine innere und eine äußere Hülle.

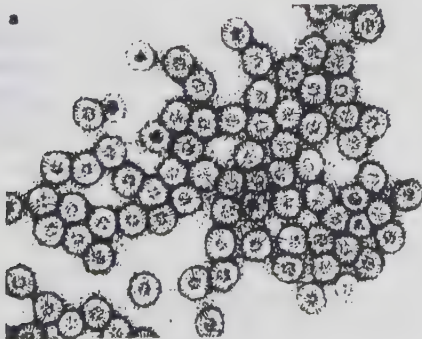


Abb. 1: HRV des Stammes Wa mit doppelter Hülle
(nach Estes et al., 1983).

Kapikian et al., 1976 und Palmer et al., 1977 geben als Durchmesser für den Kern 38 nm, für das innere Kapsid 60 nm und für das äußere Kapsid 67-68 nm an.

In den folgenden Jahren können Rotaviren aus dem Kot fast aller Säugetierspezies und Vögel isoliert werden, so daß der Fourth International Congress for Virology 1978 die Rotaviren als ein eigenständiges Genus der Familie der Reoviridae definiert (in: Matthews 1979). Rodger und Holmes schlagen 1979 ein heute weit verbreitetes Nomenklaturschema vor, das folgende Angaben zur Definition eines RV-Typs vorsieht:

- Wirtspezies, von der das Virus isoliert wurde,
- Geographische Herkunft,
- Identifikationsnummer des Virus-Stammes,
- Serotyp-Nummer und
- Elektropherotyp-Nummer.

Die Schwierigkeit dieses Schemas besteht in den nicht einheitlichen Verfahren zur Benennung der Serotypen und Elektropherotypen.

2. Das Rotavirusgenom

Beim Lösen der viralen Polypeptide durch Detergentien zerfällt das Genom in elf Segmente doppelsträngiger RNA.

Rodger et al., 1975 gelang es, diese Segmente mit Hilfe einer Gelelektrophorese zu trennen. Weitere Untersuchungen der Autoren (1977) ermittelten als Molekülgröße eine Spannweite von 2.2×10^6 bis 0.2×10^6 Daltons.

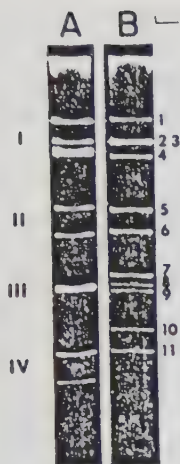


Abb. 2:

Vergleich zweier RV-Genome (nach
Estes et al., 1983)

Die Wanderungsrichtung der Elektro-
phorese verläuft von oben nach un-
ten, die Segmente sind von 1 bis
11 nummeriert.

A: RV vom Affen, Stamm SA11,
SI/S.Africa/H 96/58

B: RV vom Menschen, HRV
Hu/Texas/81

Kalica et al., 1976 benutzten die Molekülgröße zur Einteilung der RNA in vier Gruppen. Gruppe I umfaßt die Segmente 1 bis 4, Gruppe II die Segmente 5 und 6, Gruppe III die Segmente 7 bis 9 und Gruppe IV die Segmente 10 und 11 (vgl. Abb. 2).

Feinere Migrationsunterschiede innerhalb dieser Gruppen kennzeichnen Lourenco et al., 1981 zusätzlich mit kleinen römischen Buchstaben und entwickeln auf diese Weise ein Klassifikationsschema, das es erlaubt, Vergleiche zwischen verschiedenen Elektropherotypen durchzuführen.

Dieses Schema wird wegen seiner Einfachheit und relativ hohen Differenzierungsfähigkeit in der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung der ermittelten Elektropherotypen benutzt. Verschiedene epidemiologische Studien zeigen eine große Variabilität des RV-Genoms hinsichtlich des Elektropherotyps. Albert et al. ermitteln 1979 unter 57 RV-Isolaten beim Menschen 14 verschiedene Elektropherotypen (publiziert 1982 und 1983), Rodger et al. finden in einer sechsjährigen Studie 19 verschiedene Typen (Rodger et al., 1981), und Lourenco et al., 1981 können 29 Typen unter 110 Isolaten trennen und Nicolas et al., 1984 differenzieren aus 211 Isolaten 33 Typen.

Der Wert der elektrophoretischen Differenzierung wird besonders an einer Arbeit von Rodriguez et al., 1983 deutlich. Bei einer scheinbar einheitlichen RV-Epidemie bei 22 betroffenen Kindern können die Autoren 10 verschiedene Elektropherotypen unterscheiden und damit verschiedene Infektionsquellen erkennen.

Konno et al., 1984 zeigen in einer sehr interessanten mehrjährigen epidemiologischen Studie, daß in Japan zu Beginn einer Rotavirusepidemie stets ein einzelner Elektropherotyp dominiert, während im Verlauf der Epidemie sich eine Mischung aus vielen neuen Typen bildet. Die Autoren werten diesen Befund als Indiz dafür, daß unter dem Selektionsdruck der Wirtsabwehr die Viren genetisches Material austauschen und antigenetisch neue Typen formen ("gene reassortment").

Die Möglichkeit einer antigenetischen Veränderung der Virus-hülle durch Änderungen des Genoms konnten Street et al., 1982 belegen.

Im Gegensatz zu der Typenvielfalt unter Kindern und Erwachsenen ließen sich aus bisher nicht geklärten Gründen bei Neugeborenen nur zwei, bzw. vier Elektropherotypen nachweisen (Rodger et al., 1981, Mata et al., 1983, Wyatt et al., 1983 und Hoshino et al., 1984). Hoshino, 1984 findet innerhalb eines Serotyps beim Neugeborenen stets nur einen einzigen Elektropherotypen.

3. Zusammenhang zwischen Serotypen und Elektropherotypen

1982 zeigten Clarke und McCrae, daß Migrationsunterschiede in der Gelelektrophorese stets mit Unterschieden hinsichtlich der Nukleotidsequenz der jeweiligen RNA-Segmente verbunden waren. Wenn also die unterschiedlichen Elektropherotypen verschiedene RNA-Informationen repräsentieren, liegt es nahe, nach Beziehungen zwischen Sero- und Elektropherotypen zu suchen.

Mit Hilfe des ELISA und des IAHA konnten Kalica et al., 1981b zwei Subgruppen differenzieren, die sich durch ein Antigen der inneren Hülle unterscheiden, welches auf dem 6. RNA-Segment codiert wird. Die Identifizierung dieser Subgruppen ist durch die Verwendung monoklonaler Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität 1983a durch Greenberg et al. gesichert. Espejo et al. unterscheiden 1977 erstmals und erneut 1980 ein langes und ein kurzes Migrationsverhalten der Segmente 10 und 11 in der Elektrophorese. Dafür prägen sie die Namen Typ 2s ("short") und Typ 2l ("long").

Die serologische Unterscheidung der Subgruppen 1 und 2 korreliert nach Kalica et al., 1981a sowie weiteren Befunden von Rodger et al., 1981 und Kutsuzawa et al., 1982 mit der elektrophoretischen Trennung in "long-" und "short-typs". Subgruppe 2 entspricht dem langen Migrationsverhalten der Segmente 10 und 11, während Subgruppe 1 mit einer kurzen Wanderungstrecke korreliert.

Da die serologische Typendifferenzierung auf genetischen Unterschieden des Segments 6 beruht (Kalica 1981b), die der Elektropherotypen dagegen auf dem Migrationsverhalten der Segmente 10 und 11, bleibt die Korrelation der Typen bislang unerklärt.

Der prozentuale Anteil des elektrophoretischen "short-typ" zeigt zu verschiedenen Zeiten und an verschiedenen Orten eine relative Konstanz. Den Typ 2s (Serotyp 1) finden Espejo et al., 1977 in Mexico in 6 von 52 Fällen (11 %), Yolken et al., 1978 in Washington in 95 von 414 Fällen (23 %), Naguib et al., 1984 in Ägypten in 12 von 43 Fällen (28 %), White et al., 1984 in Venezuela in 35 von 252 Fällen (14 %) und Chiba et al., 1984 in Kenya in 9 von 34 Fällen (26 %). Weitere gesicherte Zusammenhänge zwischen Sero- und Elektropherotypen finden sich in der bis 1985 erschienenen Literatur nicht.

Insbesondere lassen sich auch keine Verbindungen zwischen den RNA-Profilen und Polypeptidmigrationsmustern in der Elektrophorese herstellen, wie dies in einigen früheren Arbeiten vorgeschlagen wurde (z.B. Rodger and Holmes, 1979). Die viralen Polypeptide sind sekundär vielfach veränderte Gen-

produkte (Ericson et al., 1982), so daß ein einfacher, direkter Zusammenhang wohl auch nicht zu vermuten ist (Estes et al., 1983).

Neben der Differenzierung der Rotaviren in Subgruppen anhand von ELISA- und IAHA-Verfahren findet sich in der Literatur eine Unterteilung in Serotypen mit Hilfe des Plaque-Reduktions-Neutralisationstests (PRN), z.B. bei Wyatt et al., 1983 und Hoshino et al., 1985. Die Antigene der Serotypen werden durch die RNA-Segmente 4 und 9 codiert (Greenberg et al., 1983b) und korrelieren in keiner Weise mit den Subgruppen. 1984 publizieren Hoshino et al. die bislang genaueste Unterscheidung von sieben Serotypen und zeigen, daß die Serotypen stets auch verschiedene RNA-Bandenmuster in der Elektrophorese aufweisen.

Allerdings läßt sich umgekehrt nicht vom RNA-Bandenmuster auf den Serotyp zurückschließen, da ein einzelner Serotyp in sehr viele Elektropherotypen differenziert werden kann (Hrdy et al., 1979, Gouvea et al., 1982 und Beards, 1982).

4. Epidemiologische Daten

Flewett et al. geben 1975 die Inkubationszeit mit 1 bis 3 Tagen und die Dauer der Virusausscheidung mit 1 bis 9 Tagen ab Beginn des Durchfalls an. Der Infektionsweg ist fäkal-oral, der Replikationsort der Viren die Mukosazelle des Dünndarms. Die Replikation erfolgt mit Hilfe einer RNA-abhängigen RNA-polymerase (Hruska et al., 1978 und Spence et al., 1981). Eine hohe Konzentration an proteolytischen Enzymen im Dünndarm erhöht durch Abspaltung eines Glykoproteins die Infektiosität der Viren (Flewett, 1978). Die oft postulierte Infektion der oberen Luftwege bleibt bisher unbewiesen (Flewett, 1982, Estes et al., 1983).

In den entwickelten Ländern des Westens ist das RV sowohl bei hospitalisierten wie auch bei nichthospitalisierten Kindern der häufigste Erreger akuter Gastroenteritiden (Kapikian et al., 1981, Gurwith et al., 1981, Cukor and

Blacklow, 1984). Rodriguez et al., 1980 schätzen, daß 220 bis 370 Hospitalisierungen pro 100.000 Kindern unter zwei Jahren in den USA durch Rotaviren verursacht werden.

DuPont, 1984 beziffert die Häufigkeit von Durchfällen bei amerikanischen Kindern unter 2 Jahren mit 0.8 - 1.05 pro Jahr. Dabei wird das Rotavirus als häufigster Erreger in 19 - 31 % identifiziert. Die rotaviralen Durchfallserkrankungen erfordern in 11 % eine Krankenhauseinweisung, verglichen mit einer Hospitalisierungsrate von nur 4 % bei Durchfällen anderer Genese (Koopman et al., 1984).

Infektionen, die zu besonders schwerer Dehydratation führen, betreffen vor allem Kinder im Alter von 12 bis 18 Monaten, weswegen Kinder dieses Alters die höchste Sterblichkeit an Rotaviren aufweisen (Lancet-Editorial, 1979, Cukor and Blacklow, 1984). In den Entwicklungsländern werden bei Kindern unter zwei Jahren Gastroenteritiden in über 50 % der Fälle ebenfalls durch Rotaviren hervorgerufen, während im späteren Lebensalter enterotoxische Escherichia-Coli-Arten dominieren (Black et al., 1980 und 1981, Merson et al., 1980, Guerrant et al., 1983). Insgesamt wird die Zahl der an rotaviralen Gastroenteritiden verstorbenen Kinder auf weltweit etwa eine Million Fälle geschätzt (Vesikari et al., 1983).

In den gemäßigten Breiten läßt sich ein Häufigkeitsgipfel der Infektionen in den Wintermonaten feststellen (Brandt et al., 1981 und Monto et al., 1983), während unter tropischen Bedingungen Infektionen gleichmäßig über das ganze Jahr verteilt auftreten (Soenarto et al., 1981 und Paul 1982).

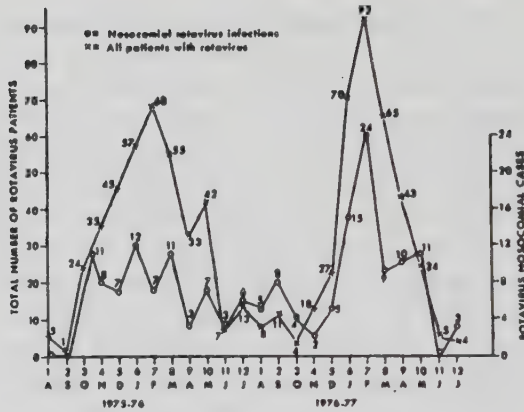


Abb. 3: Abhängigkeit rotaviraler Gastroenteritiden von der Jahreszeit in Toronto, Canada (Middleton, 1978)

5. Klinische Daten

Obwohl Neugeborene für die Infektion durch Rotaviren hochempfindlich sind, neigen sie jedoch zu einem inapparenten oder milden Verlauf (Walther et al., 1983 und Thomson et al., 1981). Möglicherweise werden durch die niedrige Konzentration an proteolytischen Enzymen im Dünndarm des Säuglings und durch Trypsininhibitoren aus der Muttermilch besonders avirulente Stämme selektiert (Steel und Torres-Medina, 1984). Banatvala et al., 1978 fanden unter 1056 Babies im Alter von fünf Tagen 343 Fälle (32,5 %), die Rotaviren im Stuhl ausschieden. Davon waren aber nur 8 % symptomatisch erkrankt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigt Bryden 1982, daß solche inapparenten Infektionen drei bis sechs Monate später keine Antikörpertiter im Serum erzeugen. Solche asymptomatischen Neugeboreneninfektionen ohne IgG Titeranstieg im Serum schützen zwar nicht vor einer Reinfektion, sie führen aber dazu, daß Erkrankungen im Alter bis zu drei

Jahren klinisch signifikant milder verlaufen (Bishop et al., 1983).

In einer prospektiven Studie unterscheiden Champsaur et al., 1984a und b drei Patientengruppen:

1. manifest Erkrankte (Durchfallerkrankung mit IgG Titeranstieg),
2. asymptomatisch Erkrankte (keine Symptome, aber IgG Titeranstieg) und
3. Virusträger (positiver Virusnachweis im Stuhl, kein IgG Titeranstieg).

Erkrankte Säuglinge finden sich besonders häufig in den Gruppen 2 und 3.

Im Alter von fünf Jahren lassen sich bei über 90 % der Kinder Antikörper in der IgG-Klasse gegen Rotaviren im Serum nachweisen. Hierbei besteht kein Unterschied zwischen Washington, Bangladesh und Mittelamerika (Kapikian et al., 1976b).

Anhand der Literatur läßt sich noch nicht eindeutig entscheiden, ob IgG Antikörper gegen Rotaviren einen Schutz vor der Infektion bieten. Totterdell et al., 1982 finden keine Korrelation zwischen Infektionsrate und IgG Titer, dagegen zeigen Ebina et al., 1984 und Ryder et al., 1985, daß ein Schutz besteht. Eine Studie von Yolken et al., 1985 kommt zu dem Schluß, daß Säuglinge, die mit Kuhmilch ernährt werden, weniger und milder verlaufende Durchfälle haben als solche, die Fertigmilchpräparate erhalten. Die Kuhmilch enthält im Gegensatz zu den Fertigpräparaten Antikörper der Klasse IgG1.

Umstritten bleibt auch die Rolle der IgA-Antikörper in der Muttermilch. Einige Autoren wie Crewe und Murphy, 1980 finden keine niedrigeren Infektionsraten bei gestillten Babies, während McLean und Holmes, 1981 in ihrer Studie einen Schutz durch mütterliche IgA-Antikörper belegen.

Die Abbildung 4, entnommen aus der Arbeit von Saulsbury et al., 1980, zeigt das Sistieren der RV-Ausscheidung mit dem Stuhl und die Senkung der Durchfallfrequenz bei einem immungeschwächten Kind durch die Gabe von Muttermilch mit HRV-Antikörpern der IgA-Klasse.

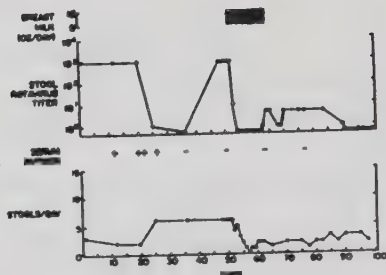


Abb. 4: Während der Gabe von Muttermilch (schwarzer Balken) sinken die Ausscheidung der Viren mit dem Stuhl und die Frequenz der Durchfälle (Saulsbury et al., 1980)

Folgeinfektionen sind sowohl für verschiedene Serotypen (Simhon et al., 1981) wie auch für verschiedene Elektropherotypen (Monto et al., 1983) belegt. Die Zahl symptomatischer Infektionen durch verschiedene Virustypen scheint jedoch auf zwei bis drei begrenzt, was auf eine schwache Kreuzimmunität schließen lässt (Black et al., 1981). Daher schlagen Vesikari et al., 1983 eine Impfung mit einem attenuierten Rinderrotavirus vor, die im Neugeborenenalter durchgeführt werden sollte.

Die Entstehung der Durchfallerkrankung erklären Davidson et al., 1977 durch den Ersatz der geschädigten Mukosazellen des Dünndarms mit an Disaccharidasen mangelhaft ausgestatteten Zellen. Dadurch entsteht ein passageres Maldigestionssyndrom.

Rotavirusinfektionen bei Erwachsenen sind seit langem gesichert (Middleton et al., 1974). Sie rufen meist nur milde, gelegentlich aber auch schwere Gastroenteritiden hervor (Echeverria et al., 1983).

Infizierte Erwachsene können auf Kinderstationen als Überträger fungieren (Hildreth et al., 1981).

Weitere Bedeutung kommt den Erwachseneninfektionen im Zusammenhang mit der sogenannten Reisediarrhoe zu. Als deren Ur-

sache finden Keswick et al., 1982 in Mexico in 17 % Rotaviren, Ryder et al., 1981 in Mexico in 26 % und Echeverria et al., 1979 in Süd-Korea in 8 %.

Die ätiologische Rolle der Rotaviren bei anderen Krankheitsbildern ist wenig gesichert und wird nur in einzelnen Arbeiten untersucht.

Yolken, 1984 berichtet in seinem Review über Lungeninfiltrate in 8 % aller Infektionen. Saitoh et al., 1981 sehen eine Korrelation zum Exanthema subitum, Salmi et al., 1978 eine zum Reye-Syndrom und Matsuno et al., 1983 eine zum Kawasaki-Syndrom.

Yolken et al., 1982 beschreiben schwere Gastroenteritiden durch Rotaviren bei Empfängern von Knochenmarkstransplantaten. Die Rolle der Rotaviren bei immundefizienten Patienten wird in dem Review von Yolken, 1984 diskutiert.

6. Diagnostik

Morinet et al., 1984 vergleichen sechs gängige Verfahren zum Nachweis von Rotaviren aus Stuhlproben. Die Tabelle 1 faßt auszugsweise ihre Ergebnisse zusammen. Auf einer Bewertungsskala von 1 bis 3 stellt die Kennzeichnung 3 die günstigste Bewertung dar.

Eigenschaft	Elektr.- Mikr.	Imm.-EM	Imm. fluor.	Rotazyme	Enzy- gnost	Rotalex
Sensitivität	1	3	2	2	3	2
Spezifität	3+	3	3	3	3	3
Reproduzier- barkeit	3	3	3	3	3	3
Praktika- bilität	1	1	2	3	3	3
Screening-Ver- wendbarkeit	1	1	1	2	3	3
Effizienz	1	1	1	3	2	3
Kosten	1	1	1	1	3	2

Tab. 1: Vergleich von sechs Methoden zum RV-Nachweis
(aus: Morinet et al., 1984)

Aus der Tabelle geht die hohe Qualität der beiden ELISA-Testverfahren, Rotazyme und Enzygnost, hervor.

Dieses Ergebnis stimmt überein mit Arbeiten von Cukor et al., 1984b und Rubenstein und Miller, 1985, die ähnliche Vergleiche durchgeführt haben.

Eine weitere Verbesserung des ELISA-Prinzips besteht in der Möglichkeit, das übliche polyvalente Meerschweinchenserum durch monoklonale Antikörper zu ersetzen (Beards, 1984 und Volker, 1983, review). Damit lassen sich Serotypen auch im ELISA zuverlässig differenzieren (Greenberg et. al., 1983a). Allerdings weisen ELISA-Verfahren eine gewisse Lücke bei Neugeboreneninfektionen auf, wo es in einem geringen Prozentsatz zu falsch negativen Resultaten kommen kann (Krause et al., 1983, Cukor et al., 1984b).

Die Latexteste eignen sich besonders gut als schnelles und billiges Screeningverfahren (Grauballe und Jarzabek, 1984 und Hughes et al., 1984).

7. Rekombinanten

Der Austausch von RNA-Segmenten verschiedener Rotaviren wurde 1980 durch Matsuno et al. bei Mischinfektionen von Affen- und Rinder-Stämmen in Zellkulturen belegt.

Greenberg et al., 1980 führten diesen Nachweis für die Mischinfektion eines humanen Stammes mit einem Rindervirus. Ebenso ist das Vorkommen von Doppelinfektionen mit verschiedenen Rotavirustypen beim Menschen gesichert (Spencer et al., 1983). Inwiefern der Mechanismus des Genaustauschs in vivo vorkommt und für die Entstehung neuer Virustypen eine Rolle spielt, ist unklar. Bislang steht der Beweis einer in vivo Bildung von Rekombinanten aus zwei humanen Rotavirusstämmen jedenfalls noch aus (Yolken, 1984).

II. ZIEL DER ARBEIT

Ausgehend von der Bedeutung, die die Differenzierung humaner Rotaviren in Elektropherotypen für epidemiologische Studien besitzt, soll dafür ein leicht praktikables Verfahren erarbeitet werden. Es wird dabei folgenden Problemen nachgegangen:

1. Die Methodik zur Gewinnung von RV-RNA aus infektiösen Stuhlproben soll bei möglichst geringem technischen Aufwand und kurzer Arbeitszeit so zuverlässig sein, daß es zu keinem nennenswerten Abbau durch unspezifische RNase-Aktivität kommt. Andernfalls ließen sich keine ausreichend scharfen Genomprofile darstellen
2. Es werden verschiedene Gelsysteme hinsichtlich ihrer Praktikabilität und ihrer Trennschärfe miteinander verglichen.
3. Weitere Vergleiche werden durchgeführt zwischen verschiedenen Methoden zur Anfärbung der RNA in den Gelen.
4. Die bei der Prüfung dieser Problembereiche dargestellten RNA-Genomprofile werden in Elektropherotypen klassifiziert und miteinander verglichen. Die vorliegende Arbeit erhebt wegen der geringen Zahl der Virusisolate nicht den Anspruch einer epidemiologischen Studie. Es wird aber der Frage nachgegangen, ob sich bereits aus dem geringen Stichprobenmaterial epidemiologische Hinweise gewinnen lassen.
5. Über die konventionellen Färbemethoden hinaus soll versucht werden, die RNA-Segmente des Genoms durch den Aufbau einer radioaktiven Base zu markieren.
 - a. Die Endmarkierung soll sowohl am 3'-Ende wie auch am 5'-Ende der RNA durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

- b. Es soll geprüft werden, ob die radioaktive Endmarkierung ebenfalls zur Darstellung der Elektropherotypen geeignet ist. Die Sensitivität der Methode wird mit den konventionellen Färbungen verglichen.

III. MATERIAL UND METHODEN

A. RNA-Extraktion

Doppelsträngige RNA wurde aus Stuhlproben von an akuter Gastroenteritis erkrankten Kindern isoliert. Diese Proben stammten aus der Kinderpoliklinik München, Pettenkoferstraße, dem virologischen Institut der Universität Mailand und aus dem Landesmedizinaluntersuchungsamt Stuttgart. Zur Extraktion gelangten nur solche Proben, die im Rotzyyme-Test (Fa. Abbott, North Chicago, USA) photometrisch gemessene Absorptionswerte von über 1.0 aufwiesen. Die Stuhlmenge lag zwischen 0.2 und 2.0 Gramm.

Zwei Methoden zur RNA-Extraktion kamen zur Anwendung:

1. Extraktion aus gereinigten Viren

Die Versuchsdurchführung folgt der Beschreibung von Espejo et al., 1980b und in ähnlicher Weise bereits 1979. Die ersten Schritte bis zur Darstellung der reinen Virusfraktion finden sich in der Arbeit von Bishop et al., 1974.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Herstellung einer gereinigten Virusfraktion. Durch ein Detergens wurden dann die Hüllen der Viren zerstört und die RNA präzipitiert.

Eine 20prozentige Stuhlsuspension wurde durch fünfminütiges, kräftiges Schütteln des Stuhls mit TSM-Puffer (0,01 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,001 M $MgCl_2$, alle Reagenzien Fa. Merck, Darmstadt) hergestellt. Anschließend wurde etwa die doppelte Menge Trifluorotrichloroäthan (Freon, Fa. Merck) hinzugefügt. Zwecks Äquilibrierung der Zentrifugenröhrchen wurde die Menge an Freon jeweils geringfügig variiert. Nach dreißigminütiger Zentrifugation bei 8'000 rpm und 4° C (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS 34, Fa. Abbott) wurde die wässrige Phase abgesaugt und das darin enthaltene Virus über Nacht bei 4° C mit 8 % (wt/vol) Polyäthylenglykol (Fa. Merck) präzipitiert. Nach der Präzipitation erfolgte eine erneute Zentrifugation über 30 Minuten bei 4000 rpm und 4° C (Haereus Christ Zentrifuge, Rotor A 4). Dadurch bildete sich ein winziges, klebriges Se-

diment am Boden der Röhrchen, so daß sich der ganze Überstand einfach dekantieren ließ. Das Sediment wurde erneut in ca. 100 µl TSM-Puffer suspendiert und dann auf einen Cäsium-Chlorid-Gradienten geschichtet. Dieser bestand aufsteigend aus 0.5 ml 1.4 g% CsCl (Fa. Merck), 0.5 ml 1.3 g% CsCl und 1.0 ml 45prozentiger Saccharose (Fa. Merck). Dieser Schichtgradient wurde in Polyallomer-Röhrchen pipettiert und nach Aufschichtung des Sediments eine Stunde bei 4° C und 40'000 rpm (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor SW 50.1) zentrifugiert.

Ab diesem Arbeitsschritt wurden nur noch silikonisierte Glaswaren und sterile Instrumente verwendet, sowie die Probe stets auf Eis gestellt.

Zwischen den CsCl-Fraktionen von 1,3 und 1,4 g% stellte sich eine opaleszierende Bande ein, die sich durch Punktion der Röhrchen auf der betreffenden Höhe absaugen ließ. Das Punktat wurde je nach Menge bis zum doppelten Volumen mit TSM-Puffer verdünnt und erneut in einem CsCl-Schichtgradienten, diesmal ohne Saccharose, zentrifugiert.

Das zweite Punktat wurde dann über etwa 3 ml 1,36 bis 1,37 g %ige CsCl-Lösung geschichtet und bis zur Äquilibrium (17 - 24 h) bei 40'000 rpm und 4° C zentrifugiert.

Die Röhrchen wurden sehr vorsichtig am Boden punktiert und in 10 bis 12 Fraktionen ausgetropft, welche anschließend alle mit dem Rotazyme-Test hinsichtlich ihres Gehalts an Rotavirusantigen überprüft wurden.

Fraktionen mit einer optischen Dichte von über 2 (höchster Wert im Rotazyme-Test) wurden gepoolt und zwei Tage in Thomapor-Folie (Fa. Reichelt, Cat.-Nr. 94 568) gegen TSM-Puffer dialysiert. Damit waren Rotaviren in sehr hoher Reinheit dargestellt, wie sie auch für die Elektronenmikroskopie verwendet werden.

Die RNA wurde durch Zerstören der viralen Hüllen mit 1/5 Volumen einer Lösung aus 6 vol% Natrium-Dodecyl-Sulfat (Fa. BDH Chemicals, Pool, England), 0,6 % 2-Mercaptoäthanol (Fa. Biorad, Richmond, California, USA) und 0,036 M EDTA (Fa. Merck) freigesetzt. Die zwanzigminütige Inkubation mit Detergens erfolgte bei Raumtemperatur. Mindestens zweimal

wurden die viralen Eiweiße durch je 1 Volumen trisgesättigtes Phenol (Phenol und Tris, Fa. Merck) und 1 Volumen Chloroform (Fa. Merck) extrahiert.

Durch Absaugen ließ sich die wässrige RNA-haltige Phase trennen und mit 0,04 Volumen 5 M NaCl, pH 5 und mit 2 Volumen reinem Äthanol (Fa. Baker, Deventer, Holland) bei -20° C über Nacht präzipitieren. Die anschließende Sedimentierung der RNA erfolgte durch Zentrifugation bei 10'000 rpm für 30' und bei -15° C.

Dekantierung und Lyophilisierung erlaubten eine erste Beurteilung der Reinheit des Sediments. Weitere Reinigung läßt sich durch resuspendieren in NaCl und Äthanol, gegebenenfalls mehrmals, erreichen.

Prinzipien zum korrekten Umgang mit RNA sind in der Arbeit von Chirgwin et al., 1979 und Mariatis, 1982 (Cold Spring Har.) beschrieben.

Das lyophilisierte Sediment wurde in ca. 100 µl Aqua bidest gelöst bei -70° C aufbewahrt.

2. Direktextraktion

Die zweite von Theil et al., 1981 beschriebene Methode beruht auf einer direkten Extraktion der RNA aus dem Stuhl mittels einer vorübergehenden Bindung an Zellulose. Sie umgeht somit die aufwendige Reinigung der Viren.

Im Rotazyme-Test hochpositive (OD über 1.0) Stühle von 0,2 bis 1,5 g wurden in je 2 ml eines Extraktionspuffers aus 0,2 M Glycin (Fa. Merck), 0,1 M Natriumhydrogensulfat (Fa. Merck), 0,6 M Natriumchlorid und 1 % Sodium-Dodecyl-Sulfat pH 9,5 suspendiert und durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 4° C und 10'000 rpm geklärt.

Der klare Überstand wurde abgegossen und mit je 3 ml trisgesättigtem Phenol (Tris und Phenol, Fa. Merck) und 3 ml Chloroform-Isoamylalkohol 25 vol:1 vol (Fa. Merck) gemischt. Die milchig-trübe Emulsion ließ sich durch Zentrifugation (2500 rpm, 4° C, 20 Minuten) trennen. Die obere, wässrige,

nukleinsäurehaltige Phase wurde abgesaugt und mit reinem Äthanol (Fa. Baker, Deventer, Holland) bis zu einer Endkonzentration von 15 vol% versetzt.

Dazu wurden 0.5 g CF 11 Zellulosepulver (CF 11 powder, Whatman Inc., Clifton, N.Y., USA) hinzugefügt und die Mischung eine Stunde lang sehr kräftig geschüttelt.

In einer 15prozentigen Äthanolkonzentration lagert sich dsRNA bevorzugt an die Zellulose an, ssRNA dagegen wesentlich schlechter.

Durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 2500 rpm und 4° C (Haereus Christ Zentrifuge) ließ sich die Zellulose wieder sedimentieren und der Überstand verwerfen.

Mehrfaches Waschen der Zellulose erfolgte durch resuspendieren in 15 vol% Äthanol und 85 vol% STE-Puffer (0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA) und erneutes Abzentrifugieren. Zuletzt wurde die Zellulosesuspension in eine ca. 20 ml fassende Glaschromatographiesäule eingefüllt und mit 70 ml STE/Äthanol, 85 vol:15 vol, abschließend gewaschen.

Nach vollständigem Austropfen der Säule wurde die dsRNA mit 10 ml reinem STE Puffer ohne Alkohol eluiert. Das Eluat wurde auf 0,25 M NaCl und 66 vol% Äthanol eingestellt und zur Präzipitation der RNA über Nacht bei -20° C aufbewahrt.

Anschließend erfolgte Zentrifugation bei 10'000 rpm, -15° C und 30 Minuten. Abgießen des Überstandes und Lyophilisieren der RNA. Falls nötig wurde die RNA mehrfach gewaschen.

B. Gelsysteme

1. Harnstoff-Agarose-Gel

Die Herstellung des Gels erfolgte in leicht modifizierter Weise der Beschreibung von Locker, 1979.

Für 50 ml Gel wurde eine Mischung hergestellt aus:

1 g Agarose (SeaPrep 15/45, bezogen durch Fa. Johnson, Erkrath), 20,94 ml Aqua bidest, 3.74 ml 0,25 M Zitronensäure (Fa. Merck) und 1,24 ml Elektrophoresepuffer aus 0,25 M Zi-

tronensäure und 0,5 M β -Alanin (Fa. Merck) pH 3,6. Diese Mischung wurde kurz aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war.

Getrennt davon wurden bei 50° C im Wasserbad 18 g Harnstoff (Urea ultrarein, Bethesda Research Laboratories Inc., Neu-Isenburg) zusammen mit 0,25 ml 20 % Natrium-Dodecyl-Sulfat in 10 ml Aqua bidest gelöst.

Beide Lösungen wurden danach intensiv vermischt und sofort in eine horizontale Gelkammer (Breite 12 cm, Länge 22 cm, Geldicke 0,3 bis 0,4 cm) gegossen. Das Gel erstarrte über Nacht bei 4° C. Wichtig ist unbedingte Erschütterungsfreiheit.

Zur Vorbereitung der RNA-Proben wurden drei weitere Lösungen hergestellt:

Lösung X: 0,25 M Citrat:0,25 M Citrat und 0,5 M β -Alanin
= 4:1

Lösung Y: 1 g Harnstoff in 0,7 ml H₂O gelöst

Färbe- : 50 mg Xylencyanol, 5 g Saccharose und 1 mM EDTA
lösung in 10 ml H₂O.

Die benötigte RNA-Menge wurde auf ein Volumen von 4 μ l eingeengt und zusammen mit 2,7 μ l Färbelösung und 17,3 μ l Lösung Y fünf Minuten lang zur Denaturierung auf 75° C erhitzt. Anschließend sofort Abkühlung auf Eis und Mischen mit 2,7 μ l der Lösung X.

Die Elektrophorese erfolgte in Puffer aus 25 mM Citrat, 50 mM β -Alanin und 0,1 % Natrium-Dodecyl-Sulfat, bei 4° C, 170 V und einer Anfangsstromstärke von 40 mA über 6 Stunden.

2. Polyacrylamid-Agarose-Gel.

Dieses senkrechte Gelsystem folgt der ursprünglichen Anleitung von Peacock und Dingman, 1968. Kalica et al., 1978 verwenden es zur Elektrophorese von Rotavirusgenomen.

Die Glasplatten und die Abstandshalter für die Gelherstel-

lung wurden sorgfältig mit Wasser, Palmoliv und zuletzt mit Äthanol und Aceton gespült.

Für die Zubereitung des Gels wurden zwei Lösungen vorbereitet und im Kühlschrank aufbewahrt:

100 ml Acrylamid-Lösung: 30 g Acrylamid (Fa. Serva, Heidelberg) und 0,7 g Bis (Fa. Serva, Heidelberg) mit Aqua bidest auffüllen.

Peacock-Dingman-Puffer (10fach):

107,8 g Tris, 55,03 g Borsäure (Fa. Merck), 9,3 g EDTA und 20 mg Polyvinylsulfat (Fa. Sigma, München) als RNase Inhibitor.

Für 30 ml Gel wurden 3 ml Acrylamidlösung, 3 ml. Peacock-Dingman-Puffer (10fach) und 14 ml Aqua bidest in einem Glaskolben mit Absaugstutzen auf 45° C vorgewärmt.

Zur gleichen Zeit wurden 150 mg Agarose (SeaKem HGT, Fa. Johnson, Erkrath) in 10 ml Aqua bidest aufgeköcht, vollständig gelöst und anschließend in den Kolben zur Acrylamid-Lösung gegossen. Im Wasserbad von 45° C erfolgte eine kurze Entgasung, die bei Beginn einer heftigen Blasenbildung beendet wurde. Der Start der Polymerisationsreaktion begann beim Hinzufügen von 30 µl TEMED (Fa. Serva, Heidelberg) und 200 µl 10prozentiger Ammonium-Persulfat-Lösung (Fa. Merck). Das Gel wurde sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und polymerisierte innerhalb von 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einer ruhigen Unterlage. Die Glasplatten-größe betrug 17,5 x 17 cm, die Spacerdicke 0,1 cm.

Die auf 10 µl eingeeingten RNA Proben wurden mit 20 µl Färbepuffer aus 50 % Saccharose, 0,01 % Xylencyanol und 0,01 % Bromphenolblau vermischt und in die Startlöcher des Gels eingefüllt.

Die Elektrophorese lief in einfach konzentriertem Peacock-Dingman-Puffer, bei 4° C, 120 V und einer Anfangsstromstärke von 30 mA ab. Eine günstige Laufstrecke ergab sich bei einer Laufzeit von etwa 6 bis 7 Stunden.

Die hier angegebenen Mengen ergeben ein Gel von 3 % PAA und

0,5 % Agarose. Bei Verwendung von 5 ml 10fachem Peacock-Dingman-Puffer erhält man 5 % PAA Konzentration.

3. Reines Polyacrylamid-Gel

Die Elektrophorese in einem 7prozentigen PAA Gel folgt der Beschreibung von Peacock und Dingman, 1967. Die technische Durchführung weist große Ähnlichkeit mit der beim PAA-Agarose-Mischgel auf. Die Gelkammer, die Vorbereitung der Glasplatten, die Acrylamid-Lösung und der Tris-Borat-Puffer werden in analoger Weise verwendet.

Zur Herstellung von 45 ml Gel wurden 10,5 ml Acrylamid-Lösung, 4,5 ml Puffer und 30 ml Aqua bidest in einen Vakuumkolben pipettiert und wie bereits beschrieben, entgast.

Nach Zugabe von 300 µl Ammoniumpersulfat und 50 µl TEMED wurde das Gel sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und drei Stunden lang erschütterungsfrei der Polymerisation überlassen.

Die Proben bestanden aus 10 µl RNA und 20 µl Färbepuffer aus 50 % Saccharose, 0,1 % Bromphenolblau und 0,1 % Xylenzanol. Die Elektrophorese erfolgte mit einfach konzentriertem Tris-Borat-Puffer bei 4° C, 150 V, einer Anfangsstromstärke von 30 mA und einer Laufzeit von 6 bis 7 Stunden.

Die beschriebenen Mengenangaben beziehen sich auf ein Gel von 7 % PAA. Für ein 5prozentiges Gel wurden 7,5 ml Acrylamid und 33 ml Aqua bidest verwendet.

C. Färbungen

1. Ethidiumbromidfärbung

Sofort nach der Elektrophorese wurden die Gele in einen Färbepuffer aus 50 mM Borsäure (Fa. Merck), 5 mM Natrium-tetraborat (Fa. Merck), 10 mM Natriumdisulfat (Fa. Merck) und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid gelegt. Nach einer Stunde waren die Gele meist ausreichend gefärbt, so daß sie unter UV-Licht mit einer Sofortbildkamera photographiert werden konnten (Kodak Plus X Film).

Bei höheren Ethidiumbromidkonzentrationen besteht die Gefahr einer Überfärbung.

2. Silberfärbung mit Natriumborhydrid

Die von Sammons et al., 1981 angegebene Methode wenden Herring et al., 1982 zur Färbung von Rotavirusgenomen an. Zu färbende Gele wurden dreißig Minuten in 10 % Äthanol (Fa. Baker, Deventer, Holland) und 0,5 % Essigsäure (Fa. Merck) gewaschen und anschließend in einer Lösung aus 0,38 g Silbernitrat (Fa. Merck) in 200 ml Aqua bidest eine Stunde lang bei leichtem Schütteln gefärbt. Unspezifisch am Gel anhaftendes Silber wurde danach durch viermaliges, kurzes Abspülen (10 sec) mit Aqua bidest entfernt.

Die Entwicklung erfolgte in einer Lösung aus 17,5 mg Natriumborhydrid (Fa. Merck), 0,81 ml 37prozentigem Formaldehyd (Fa. Merck) und 3 g Natriumhydroxyd (Fa. Merck) in 200 ml. Aqua bidest. Kurz vor dem Erreichen der gewünschten Schwärzung der RNA-Banden wurden die Gele in eine Fixierlösung aus 7,5 g Natriumkarbonat in 1 Liter Wasser gelegt. Die Entwicklungsreaktion läuft noch einige Sekunden weiter. Nach 10 Minuten wurde die Fixierlösung erneut und nach weiteren 10 Minuten die Gele in Plastikfolie eingeschweißt und im Kühlschrank gelagert.

Die beste Dokumentation der RNA Profile wurde erreicht, in-

dem die Gele auf eine Glasplatte gelegt und gegen eine Lichtquelle photographiert wurden.

3. Silberfärbung mit Kaliumdichromat

Diese Methode ist von Goldman und Merrill, 1982 angegeben worden.

Die Gele wurden in 50 % Methanol und 12 % Essigsäure drei Minuten und dann erneut in 10 % Methanol und 5 % Essigsäure zwanzig Minuten fixiert. Danach wurden die Gele fünf Minuten in 3,4 mM Kaliumdichromat und 3,2 mM Salpetersäure (Fa. Merck) gelegt. Unspezifisch anhaftendes Kaliumdichromat ließ sich durch 10minütiges Waschen in Aqua bidest entfernen. Die Färbung der Gele erfolgte in 12 mM Silbernitratlösung unter leichtem Schütteln und erneutem nachfolgendem Waschen während 10 Minuten in Aqua bidest. Der Entwicklungsvorgang lief in 0,28 M Natriumkarbonat (wasserfrei, Fa. Merck) und 0,05 vol% Formaldehyd ab und wurde in 1 % Essigsäure gestoppt. Auch hier ist wiederum zu beachten, daß die Entwicklungsreaktion noch für kurze Zeit in der Essigsäure weiterläuft. Zur Entwicklung wurden insgesamt drei Soda-Formaldehyd-Bäder vorbereitet, da ein intensiver wolziger Niederschlag auftrat. Sobald der Entwicklungsstand der Gele nicht mehr zu beurteilen war, wurden sie in ein neues Bad gebracht.

Abschließend wurden die Gele 20 Minuten in Wasser gewaschen und in Folie zur Aufbewahrung eingeschweißt.

4. Silberfärbung mit Benzotriazol

Diese Silberfärbemethode ist von Merrill et al., 1981 angegeben worden und wird hier leicht modifiziert beschrieben.

Die Gele wurden in 10 % Methanol und 5 % Essigsäure fixiert und in eine Lösung aus 350 ml Aqua bidest, 2 ml 37 % Formal-

dehyd und 4 ml Benzotriazol (Anti-Fog Nr. 1, Fa. Eastman Kodak, USA) gelegt. Die Konzentration des Benzotriazol betrug 120 mg pro Liter. In einer Dunkelkammer wurden dazu 0,8 g Ammoniumnitrat (Fa. Merck) und 0,8 g Silbernitrat, jeweils in 20 ml Aqua bidest gelöst, dazu gemischt. Anschließend wurden die Gele mit 2 Leuchtröhren von je 300 Watt im Abstand von 30 cm belichtet. Die Entwicklung erfolgte in einer Lösung aus zwei Liter einer Lösung aus 60 g Natriumkarbonat, 8 ml 37 % Formaldehyd, 20 ml Benzotriazol (120 mg/l) und Aqua bidest. Nach Entfernen des Silbernitrats wurde mehrfach Entwickler über die Gele gegossen. Nach kurzem Schütteln stellte sich ein schwarzer Niederschlag ein, worauf der Entwickler abgegossen und durch frischen ersetzt wurde. Die Entwicklungsreaktion wurde am Ende in 3 % Essigsäure gestoppt, das Gel 20 Minuten in Aqua bidest gewaschen und zur Aufbewahrung im Kühlschrank in Folie eingeschweißt.

Die folgende Tabelle 2 faßt zusammen, welche Färbemethoden bei welchen Gelelektrophoresesystemen zur Anwendung kamen.

Gel	Färbungen
Urea/Agarose	Ethidiumbromid
PAA/Agarose	Ethidiumbromid
reines PAA	Ethidiumbromid, Silber mit Na^+ -Borhydrid Silber mit K^+ -Dichromat, Silber mit Benzotriazol

Tab. 2: Färbungen der Gele

Polyacrylamid-Agarose-Mischgele wurden versuchsweise auch mit Silber angefärbt. Da Silber die Agarose mit anfärbt, war bereits aus theoretischen Erwägungen mit einem geringen Kontrast zu rechnen.

D. Klassifizierung der Elektropherotypen

Zur Klassifizierung der RNA-Bandenmuster in Elektropherotypen wurde ein von Lourenco et al., 1981 vorgeschlagenes Schema benutzt. Die Autoren teilen die elf RNA-Segmente in vier Gruppen ein. Gruppe I umfaßt Bande 1 bis 4, Gruppe II die Banden fünf und sechs, Gruppe III Bande 7 bis 9 und Gruppe IV die Banden 10 und 11. Unterschiede hinsichtlich der Migration innerhalb dieser Gruppen werden mit den kleinen Lettern a bis f belegt. Einen Überblick gibt folgende Abbildung aus der Originalarbeit von Lourenco et al.:

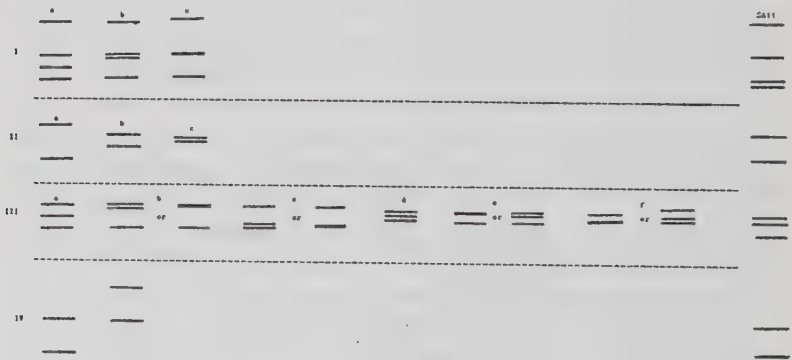


Abb. 5: Elektropherotypen nach Lourenco et al., 1981

Als Referenz dient der tierische Rotavirusstamm SA 11, der wegen seiner leichten Anzüchtbarkeit in Zellkulturen mit zu den am besten untersuchten Stämmen gehört.

Erweiternd zum Originalschema wird in der vorliegenden Arbeit das Charakteristikum einer kurzen Laufstrecke der Segmente 10 und 11 als IV 1 und das einer langen Laufstrecke als IV 2 bezeichnet. Damit wird der Korrelation zur serologischen Einteilung in die Subgruppen 1 und 2 Rechnung getragen, die von Kalica et al., 1981b belegt ist. Damit stimmen folgende taxonomische Klassifizierungen überein:

Espejo	1980: short-migration-type	long-type
Kalica	1981: subgroup 1	subgroup 2
Lourenco	1981 I _x II _x III _x IV 1	I _x II _x III _x IV 2

Es ist zu beachten, daß alleiniges Einteilungskriterium für die Elektropherotypen das Migrationsverhalten der Segmente ist, so daß über die Ähnlichkeit der Viren hinsichtlich des RNA-Informationsgehaltes und der Eiweiße keinerlei Rückschlüsse gezogen werden können.

E. RNA-Endmarkierung

Eine erste Reihe von Versuchen wurde durchgeführt mit dem Ziel, die RNA-Segmente am 5'-Ende zu markieren. Weitere Versuche verglichen zwei Methoden zur radioaktiven Endmarkierung am 3'-Ende.

1. 5'- Endmarkierung mit ³²ATP und PNK

Die von Maxam und Gilbert 1977 beschriebene Methode hat sich zur weitverbreiteten Standardmarkierung von DNA und RNA am 5'-Ende entwickelt. Der hier verwendete Versuchsansatz ist in der Zusammensetzung einiger Puffer geringfügig modifiziert und benutzt alkalische Phosphatase aus Kälberdünndarm (AP, Fa. Böhringer, Ingelheim) anstelle von bakterieller alkalischer Phosphatase.

Prinzip der Methode:

Eine Phosphatase-Behandlung stellt sicher, daß möglicherweise am 5'-Ende vorhandene Phosphatreste von der RNA entfernt werden. Ein zweites Enzym, Polynukleotidkinase, kann dann die Reaktion zwischen radioaktiv markiertem Adenosintriphosphat (ATP γ -³²P, Fa. New England Nuklear) und den 5'-Enden vermitteln.

Versuchsdurchführung:

200 pM AP (40'000 g/Mol) wurden auf das Volumen von 1 μ l eingeeengt. In ein Eppendorfhütchen wurden dann pipettiert:

1 μ l AP	
8 μ l RNA (ca. 1 μ g)	
1 μ l Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 (50 mM)	
10 μ l Aqua bidest	
20 μ l Gesamtvolumen	

Dieses Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei 37° C inkubiert, anschließend 4 μ l 60 mM Nitriloacetat pH 7,0 hinzugefügt und weitere 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Ein zweiminütiges Erhitzen auf 100° C zerstörte die Phosphatase. Zum Schutz der RNA mußte das Eppendorfhütchen dann sofort auf Eis gestellt werden.

Zur Extraktion des denaturierten Eiweißes wurde Chloropan benutzt, eine Mischung aus 500 g Phenol, 500 ml Chloroform und 0,5 g 8-Hydroxy-chinolin, die mit ANE-Puffer gesättigt ist. ANE-Puffer besteht aus 1,36 g Natriumacetat (10 mM), 5,8 g NaCl (0,1 M), 0,372 g EDTA (1 mM) und Aqua bidest bis zum Volumen von einem Liter.

Zur Chloropan-Extraktion wurde folgender Ansatz vorbereitet:

24 μ l	Phosphatase-RNA-Gemisch
66 μ l	H ₂ O
10 μ l	Tris/HCl, 1M, pH 7,5
200 μ l	Chloropan
400 μ l	Gesamtvolumen

Durch vorsichtiges Schütteln ergab sich eine Suspension, die sich rasch in eine klare, wässrige, RNA-haltige und in eine trübe, eiweißhaltige Phase trennte. Die wässrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen und noch zweimal weiter mit Chloropan extrahiert. Anschließend wurde dreimal eine Extraktion mit 500 μ l eiskaltem Äther durchgeführt (Fa. Baker, Deventer, Holland).

Zur Präzipitierung der RNA wurden pro 100 μ l Lösung 10 μ l

0,3 M Na-Acetat pH 5 - 7 und 275 μ l Äthanol hinzugefügt und bei -20° C über Nacht inkubiert. Zentrifugation bei 10'000 rpm, -15° C und 30 Minuten sedimentierte die RNA, so daß der Überstand verworfen werden konnte.

Die Reaktion zwischen dem markierten ATP und der RNA lief in folgendem Ansatz ab:

0 μ l ATP (γ - ³² P), 200 pM, lyophilisiert	
0 μ l RNA, ca. 1 μ g, lyophilisiert	
2 μ l PNK (Fa. Böhrringer, 3'-phosphatase-frei)	
3 μ l Mix (Zusammensetzung wie unten)	
5 μ l H ₂ O	
10 μ l Gesamtvolumen	

Zusammensetzung des Mix:

50	μ l 1 M Tris/HCl, pH 7,5
10	μ l 1 M MgCl ₂
50	μ l 0,1 M Dithiothreitol (Fa. Sigma, München)
	0,5 μ l Rinderserumalbumin (50 mg/ml, Fa. Böhrringer)
239,5	μ l H ₂ O
350	μ l Gesamtvolumen

Der Mix stellt die für das Enzym notwendigen bivalenten Ionen zur Verfügung und stabilisiert pH-Wert und Enzymprotein. Die Reaktion lief über 70 Minuten bei 37° C ab und wurde anschließend durch Addition von 4 μ l 50 mM EDTA und 30 Sekunden Erhitzen auf 100° C gestoppt.

Eine Gelfiltration sollte das radioaktive ATP und eventuell markierte RNA anhand ihrer unterschiedlichen Molekülgröße trennen. Es wurde das Biogel A-5 m (100 - 200 mesh, Fa. Bio-rad, Kat. Nr. 151-0740) verwendet.

1,5 ml des Gel wurden in eine sterile 5 ml Falcon-Pipette gefüllt, diese bei 2 ml abgeschnitten und mit TE-Elutionspuffer äquilibriert.

Für den Elutionspuffer wurden 200 mM Tris (48,45 g), 2 mM EDTA (1,5 g) und 1 % SDS (20 g) mit Aqua bidest auf 2 Liter

aufgefüllt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt.

Das Gel besteht aus innen hohlen, mit der Oberfläche durch Poren verbundenen Agarosekügelchen, die Moleküle mit unterschiedlicher Größe auftrennen können. Das kleine ATP kann in die Poren eindringen und muß daher eine viel längere Laufstrecke zurücklegen als die großen RNA-Moleküle, die außen an der Agarose vorbei direkt eluiert werden.

Nachdem das Gel mit Elutionspuffer getränkt sich vollständig abgesetzt hatte, wurden folgende Fraktionen vorsichtig darauf geschichtet:

1. Fraktion : 400 µl TE + 14 µl Probe
2. Fraktion : 400 µl TE
3. - 22. Fraktion: je 120 µl TE

Eine Fraktion wurde erst dann auf die Säule pipettiert, wenn die vorherige vollständig in die Agarose eingedrungen und ein entsprechendes Eluat in einem Eppendorf-Hütchen aufgefangen war. Die Radioaktivität der 22 eluierten Fraktionen wurde in einem Szintillator gemessen (Szintillatorflüssigkeit Aquasol, Fa. NEN).

Die Hälfte des Reaktionsgemisches wurde in einem Fall zur Kontrolle direkt zusammen mit 23 µl Färbepuffer (30 % Saccharose und 0,1 % Xylenzylanol) auf ein 7 % PAA-Gel aufgetragen und durch eine Elektrophorese getrennt. Dieses Gel wurde anschließend auf eine Photoplatte (Kodak X-O-Mat mit Verstärkerfolie) gelegt und eine Woche bei -70° C exponiert. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, daß selbst sehr kleine Mengen möglicherweise markierter RNA nicht dem Nachweis entgingen.

2. 3'-Endmarkierung mit 32 pCp und T_4 -RNA-Ligase

a. McCrae, 1981

Der erste in der vorliegenden Arbeit zur Markierung der RNA am 3'-Ende untersuchte Versuchsansatz ist von McCrae 1981 beschrieben worden.

Ca. 10 μ g RNA wurden in einem Eppendorf-Hütchen auf das Volumen von 0 μ l eingeeengt. In dieses Hütchen wurden 200 μ Ci 32 pCp (Cytidine 3', 5'-Bis-Phosphat, 5'- γ 32 P, Fa. NEN), 7,5 μ mol Hepes-Puffer pH 8,3, 0,5 μ mol Dithiotreitol, 1,5 μ mol $MgCl_2$, 0,75 nmol ATP, 10 % Dimethylsulphoxid, 10 % Glycerin (Fa. Merck) und 20 Einheiten T_4 -RNA-Ligase (Fa. PL Biochemicals) bei 4° C inkubiert. Die Gesamtmenge von 100 μ l wurde nach 19 Stunden Reaktionszeit mit weiteren 100 μ l einer Lösung aus 100 mM Tris-HCl (pH 8), 0,2 % SDS und 1 M NaCl vermischt. Dadurch wurde das Enzym zerstört.

Zum Schutz der viralen RNA wurden 20 μ g Hefe t RNA in einem Volumen von 20 μ l hinzugefügt.

Trennung der markierten dsRNA vom radioaktiven Nukleotid, Messung der Radioaktivität und Elektrophorese im 7 % PAA-Gel wurden wie bei der 5'-Endmarkierung beschrieben, durchgeführt.

b. England et al., 1980

Der zweite Versuchsansatz folgt der Beschreibung von England und Uhlenbeck aus den Jahren 1980 und 1978. In diesen Artikeln finden sich detaillierte Angaben zur Reaktionskinetik der T_4 -RNA-Ligase vermittelten Reaktion. Die Autoren weisen darauf hin, daß befriedigende turnover-Raten von der T_4 -RNA-Ligase nur erreicht werden, wenn genügend 3'-Enden als Substrate zur Verfügung stehen. Bei sehr großen RNA-Molekülen sinkt die Zahl der 3'-Enden relativ zur RNA-Konzentration stark ab, weswegen die Reaktion unter der Bedingung des Substratmangels ablaufen muß.

Es kommt die Schwierigkeit hinzu, daß die Affinität von RNA zum Enzym mit zunehmender Molekülgröße abnimmt.

Ein drittes Problem liegt in der Nichtanzüchtbarkeit vieler humaner Rotaviren in Zellkulturen, so daß es meist nicht möglich ist, RNA in genügend großer Menge zu beschaffen. Deshalb geben England et al. sehr hohe Enzymkonzentrationen an, die der niedrigen Affinität Rechnung tragen.

Versuchsdurchführung:

In ein Eppendorf-Hütchen A werden pipettiert:

- 0 µl RNA (ca. 2 µg, lyophilisiert)
- 10 mM MgCl₂
- 50 mM Hepes-Puffer pH 8,3
- 15 vol% Dimethylsulphoxid
- 10 µl Rinderserumalbumin (Fa. Böhringer), 10 mg/ml

Dieses Gemisch wird durch Lyophilisieren auf ein Volumen von 0 µl eingengt.

Ein zweites Hütchen B enthält 0,1 µM ³²pCp (2900 Ci/mM, Fa. NEN), ebenfalls lyophilisiert.

Die T₄-RNA-Ligase liegt vor in einer Lösung, die 50 % Glycerin, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM DTT und 50 µM ATP enthält. 90 Einheiten des Enzyms (50 µl in einer Konzentration von 1,8 E/µl) wurden in das Hütchen A pipettiert und durch häufiges, vorsichtiges Auf- und Abziehen mit der Pipette gemischt. Anschließend wurde das RNA-Enzym-Gemisch in das Hütchen B mit dem ³²pCp pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 15° C. Nach 10 Stunden wurde die Reaktion wie folgt abgestoppt:

In das Hütchen B mit 50 µl Substrat-Enzym-Gemisch wurden pipettiert:

- + 5 µl 1 % SDS, gut aber vorsichtig mischen
- + 95 µl TNE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 M NaCl
1 mM EDTA)
- + 70 µl Äthanol
- + ca. 10 mg Whatman CF 11 Zellulose

Der Inhalt dieses Eppendorfhütchens wurde eine Stunde lang kräftig geschüttelt, so daß sich die RNA an die Zellulose anlagern konnte. Unter den hier angegebenen Bedingungen von 35 vol% Äthanol lagern sich alle Nukleinsäuren und Nukleotide an die Zellulose an.

Anschließend wurde die Zellulose in eine als Chromatographiesäule dienende Pasteurpipette umgefüllt und mit 1 ml TNE/Äthanol (65:35 vol%), danach mit 1 ml TNE/Äthanol (85/15 vol%) und zuletzt mit 1 ml reinem TNE-Puffer eluiert. Auf diese Weise wurden sukzessive zunächst die kleinen einsträngigen Nukleinsäuren und Nukleotide entfernt und erst im letzten Eluat die dsRNA.

Präzipitation, Lyophilisation und Elektrophorese im 7 % PAA-Gel wurden durchgeführt wie zuvor beschrieben.

IV. ERGEBNISSE

A. Vergleich der Extraktionsmethoden

1. Nachweis der RNA mit Polyacrylamidgelen

In drei Fällen wurde eine Stuhlprobe halbiert und getrennt nach den beschriebenen Verfahren von Espejo und Theil aufgearbeitet. Die jeweils extrahierte RNA wurde dann in je zwei Verdünnungsreihen auf ein gemeinsames PAA-Gel aufgetragen. Nach Elektrophorese und Silberfärbung wurde verglichen bis zu welcher Verdünnung sich die RNA-Profile nachweisen ließen.

Die folgende Abbildung 6 zeigt eins dieser Gele:



Abb. 6:

Vergleich der RNA-Extraktionsmethoden

Auftrag eines Virus Genoms aus Stuttgart

Bahn 1 1: 5

Bahn 2 1: 20

Bahn 3 1:100

Bahn 4 1: 5

Bahn 5 1: 20

Bahn 6 1:100

Vergleich:

Bahn 1 - 3 Direktextraktion nach Theil 1981,

Bahn 4 - 6 Extrakt aus gereinigten Virus nach Espejo, 1980

Die Abbildung 6 zeigt, daß die direkt extrahierte RNA bis zur Verdünnung von 1:100 nachweisbar ist, gegenüber einer Nachweisgrenze von 1:20 bei der aus Viren extrahierten RNA.

Die Ergebnisse aller drei Gelelektrophoresen faßt die Tabelle 3 zusammen.

	Virus	Ergebnis im ELISA	letzter Espejo	Titer Theil	Färbung
Gel 1 (Abb. 6)	Stutt- gart	OD > 2	1:20	1:100	Silber
Gel 2	München Poli- klinik	OD > 2	1:20	1: 20	Silber
Gel 3	München Poli- klinik	OD = 1.84	1: 5	1: 10	Ethidiumbr.

Tab. 3: In zwei von drei Fällen ist die durch Direktextraktion dargestellte RNA noch in höheren Verdünnungsstufen nachweisbar als die RNA aus den gereinigten Viren

2. Nachweis der RNA durch Absorptionsspektren

In sieben Fällen wurden Absorptionsspektrogramme aus einem Probenaliquot im Frequenzbereich zwischen 220 - 320 nm gemessen. Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, läßt sich aus dem Adsorptionskoeffizienten und der Differenz der optischen Dichte die Gesamtmenge der in der Probe vorhandenen RNA berechnen.

Anhand eines Beispiels wird eine solche RNA-Mengenbestimmung durchgeführt:

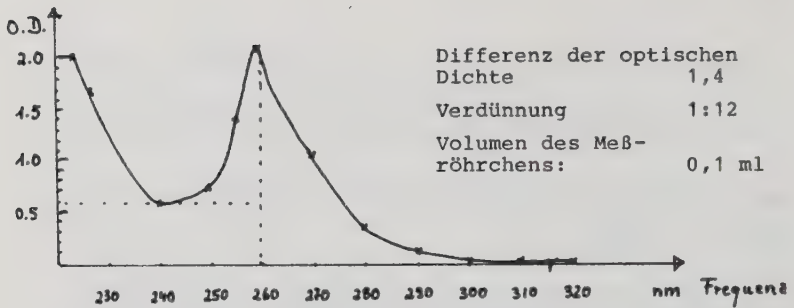


Abb. 7: Absorptionsspektrum für ein RNA-Aliquot im Frequenzbereich zwischen 320 und 220 nm.

Zur Berechnung der Ausgangsmenge an RNA multipliziert man:

$$\begin{aligned}
 & 0,1 \text{ ml (Probenvolumen, in dem sich das RNA-Aliquot befindet)} \\
 & \times 12 \quad (\text{Aliquotmenge betrug } 1/12) \\
 & \times 0,5 \quad (\text{Korrektur der Vergrößerung der Aufzeichnung}) \\
 & \times 1,4 \quad (\text{ermittelte Differenz der optischen Dichte bei } 260 \text{ nm}) \\
 & \times 25 \text{ } \mu\text{g/ml (A}_{260} \text{ für dsRNA)} \\
 \hline
 & = 21 \text{ } \mu\text{g} \quad (\text{Das untersuchte Isolat enthält ca. } 21 \text{ } \mu\text{g dsRNA})
 \end{aligned}$$

In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse aller RNA-Mengenbestimmungen zusammengefaßt.

Isolat-Nr.	Stuhlmenge	RNA-Menge	Extraktionsverfahren
1 (Polikl. München)	2 g	21 μ g	Direktextraktion
2 (Mailand)	1,2 g	17,5 μ g	"
4 (München)	2 g	24 μ g	"
7 (München)	2,8 g	24 μ g	"
12 (München)	0,9 g	14 μ g	"
3 (Stuttgart)	1,77 g	10,5 μ g	Virusextrak.
14 (München)	1,94 g	14 μ g	"

Tab. 3: Isolierte RNA-Mengen aus verschiedenen Stuhlproben.

Obwohl eine statische Auswertung bei der geringen Stichprobenzahl nicht möglich ist, zeigen die Ergebnisse, daß die Direktextraktion mindestens gleich gute oder sogar bessere RNA-Extrakte liefert als das Verfahren nach Espejo et al., 1980.

B. Vergleich der Gelsysteme

1. Das Harnstoff-Agarose-Gel

Wie die Abbildung 8 zeigt, gelang es nicht, im Harnstoff-Agarose-Gel das RV-Genom scharf genug zu trennen, um sichere Aussagen über sein RNA-Profil zu machen. In keinem Fall konnte eine Differenzierung des Elektropherotyps vorgenommen werden.



Abb. 8: Elektrophorese im Harnstoff-Agarose-Gel

Dargestellt sind zwei RNA-Isolate aus München.

Die ungleichmäßig denaturierten RNA-Komplexe weisen auf eine geringe Wanderungsstrecke im Gel auf.

2. Polyacrylamid-Agarose-Mischgel

Bei einer Konzentration von 0,5 % Agarose und 3 % PAA trennt das Genom die RNA-Segmente scharf auf. Die Abbildung 9 zeigt das Genom eines Rotavirus aus München.

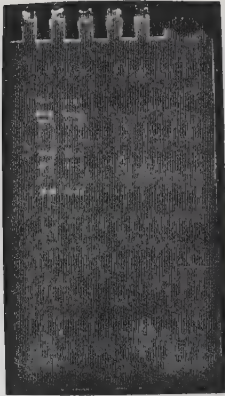


Abb. 9: Das Genom eines RV aus München.
im PAA-Agarose-Gel

Insgesamt wurde der Elektropherotyp bei 8 Virusisolaten mit PAA-Agarose-Mischgelen differenziert.

3. Reines Polyacrylamidgel

Bei sehr leichter technischer Handhabung lieferte dieses Gel system RNA-Profile von sehr guter Trennschärfe. Die Abbildung 10 zeigt ein 7 % PAA-Gel, auf dem Virusisolate mit unterschiedlichem Elektropherotyp zu sehen sind.

Die Abbildung 11 zeigt ein 5 % PAA-Gel, das sich bei gleicher Elektrophoresezeit durch eine etwas weitere Laufstrecke der RNA-Segmente auszeichnet.

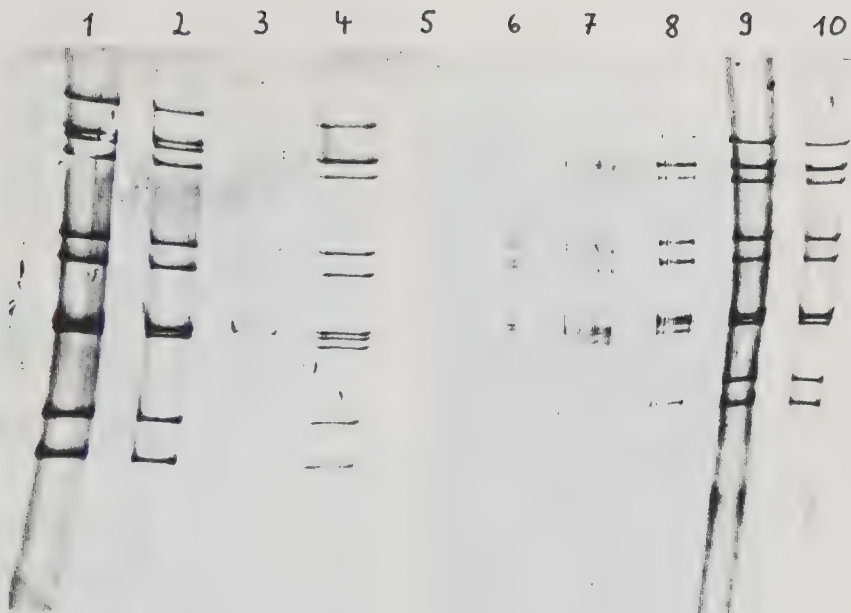


Abb. 10: 7 % PAA-Gel

Aufgetragen sind:

Bahn 1	1: 5	Isolat Nr. 1	Bahn 4	1: 5	Isolat Nr. 2
2	1: 20	(München)	5	1: 20	(Mailand)
3	1:100		6	1:100	
Bahn 7	1: 10	Isolat Nr. 3	Bahn 9	1: 10	Isolat Nr. 4
8	1: 20	(Stuttgart)	10	1: 20	(München) short-type

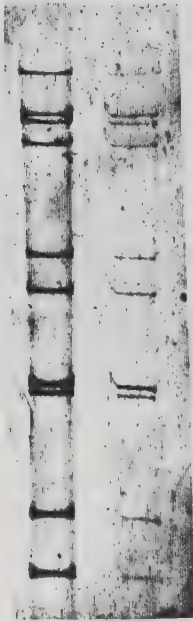


Abb. 11 rechts: Elektrophorese im 5 % PAA-Gel. Dargestellt ist das Genom des Isolats Nr. 10 aus Mailand. Der Vergleich mit dem Genom des Isolats 7 aus München (links) zeigt, daß es sich um einen Typ mit einem kurzen Migrationsverhalten der Banden 10 und 11 handelt.

Ein weiterer short-type ist in der Abbildung 10, Bahn 9 und 10 zu sehen.

C. Vergleich der Färbemethoden

1. Ethidiumbromid im Vergleich zu Silber mit Natriumborhydrid

In zwei Fällen wurde RNA desselben Virus auf ein reines Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gele wurden anschließend halbiert und einerseits mit Ethidiumbromid, andererseits mit der Silber-Natriumborhydrid-Methode angefärbt.

Eines der beiden Gele ist in der Abbildung 12 dargestellt.

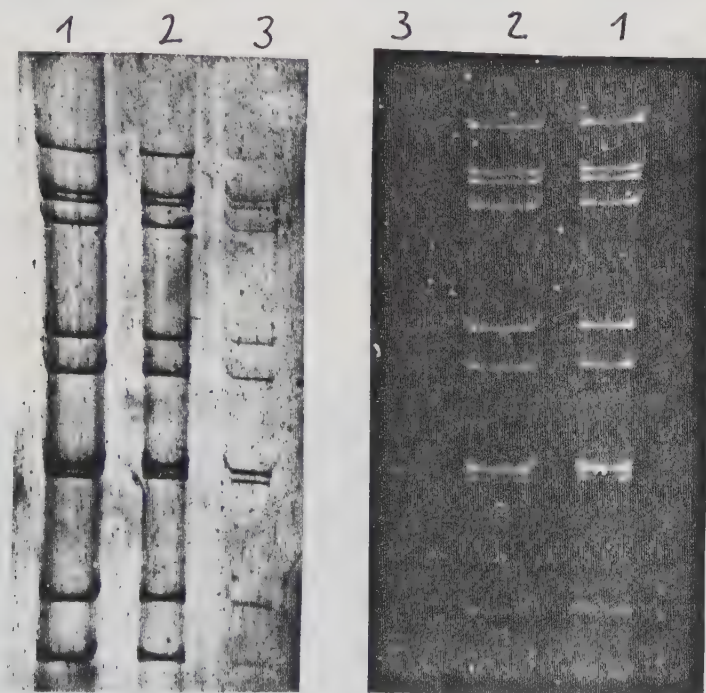


Abb. 12: Virusisolat Nr. 7 (aus München)
 Links: Silber-Natriumborhydrid-Färbung
 Bahn 1 1: 10
 Bahn 2 1: 20
 Bahn 3 1:100
 Rechts: Ethidiumbromid-Färbung
 Bahn 1 1: 5
 Bahn 2 1: 10
 Bahn 3 1:100 (kein Bandennachweis mehr)

Bei dem zweiten angefertigten Vergleichgel wurde mit Ethidiumbromid die RNA bis zu einer Verdünnung von 1:5, mit Silber-Natriumborhydrid bis zu einer Verdünnung von 1:80 angefärbt. In beiden Gelen ließen sich damit die RNA-Banden mit der Silberfärbung empfindlicher nachweisen.

2. Silber-Natriumborhydrid im Vergleich zu Silber-Kaliumdichromat

Der Vergleich zwischen den beiden Silberfärbemethoden mit Natriumborhydrid und Kaliumdichromat hinsichtlich der Empfindlichkeit wurde anhand von vier Gelen geführt. Wieder wurden je zwei Verdünnungsreihen desselben RNA-Isolats auf ein Gel aufgetragen und dieses nach der Elektrophorese getrennt angefärbt. Ein Beispiel zeigt die Abbildung 13.

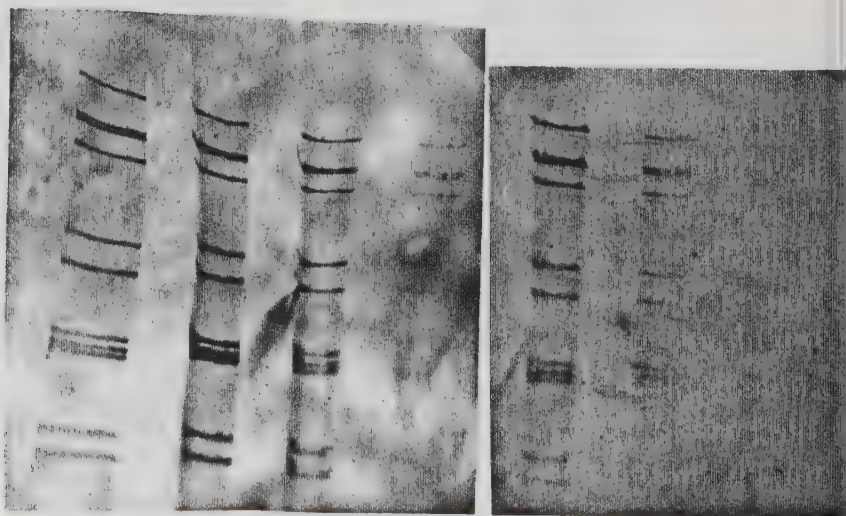


Abb. 13: Vergleich zwischen Natriumborhydrid und Kaliumdichromat. Dargestellt ist das Genom des Virusisolats Nr. 8 (München)

Links: Natriumborhydrid		Rechts: Kaliumdichromat	
Bahn 1	1: 5	Bahn 5	1: 5
Bahn 2	1: 10	Bahn 6	1: 10
Bahn 3	1: 50	Bahn 7	1: 50
Bahn 4	1:200	Bahn 8	1:200

Die Ergebnisse aller vier Gelelektrophoresen sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt. Es zeigt sich eine 4- bis 20fach höhere Nachweisgrenze bei der Silberfärbung mit Natriumborhydrid.

Virusisolat	Gel	letzte gefärbte Verdünnung	
		$\text{Na}^+ - \text{BH}^-$	$\text{K}_2^+ - \text{CrO}_4^{--}$
Nr. 8 (Mün)	7 % PAA	1:200	1: 10
Nr. 1 (Mün)	7 % PAA	1:100	1: 10
Nr. 12 (Mün)	5 % PAA	1:100	1: 10
Nr. 6 (Stutt)	PAA/Agarose	1: 20	1: 5

Tab. 4: Ergebnisse des Vergleichs der Silberfärbungen mit Natriumborhydrid und Kaliumdichromat

3. Silber-Natriumborhydrid im Vergleich zu Silber-Benzotriazol

Der Vergleich zwischen den Silberfärbungen mit Natriumborhydrid und mit Benzotriazol wurde anhand von drei Gelen geführt. Wie bereits beschrieben, wurden je zwei Verdünnungsreihen auf Gelhälften aufgetragen und getrennt angefärbt. In der Abbildung 14 ist eines der Gele dargestellt.

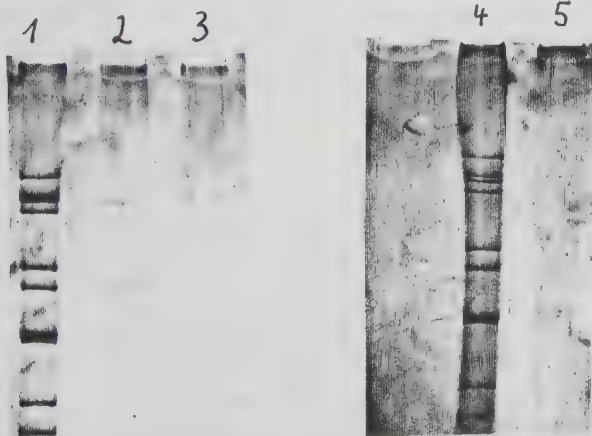


Abb. 14: Vergleich zwischen Natriumborhydrid und Benzotriazol. Dargestellt ist das Genom des Isolats Nr. 9 (München)

links: Benzotriazol

rechts: Natriumborhydrid

Bahn 1 1: 50

Bahn 4 1: 50

Bahn 2 1:100

Bahn 5 1:100

Bahn 3 1:200

Eine Übersicht über die Ergebnisse aller drei Gele gibt die Tabelle 5.

Virusisolat	Gel	letzte gefärbte Verdünnung	
		Na ⁺ -BH ⁻	Benzotr.
Nr. 9 (Mün)	7 % PAA	1: 50	1:100
Nr. 10 (Mail)	7 % PAA	1:100	1:200
Nr. 5 (Stutt)	5 % PAA	1:100	1: 50

Aus der Tabelle läßt sich keine eindeutige Überlegenheit einer der beiden Methoden ablesen.

D. Übersicht der Elektropherotypen

Klar erkennbare RV-Genomprofile wurden aus 22 verschiedenen Stuhlproben isoliert, 11 davon durch Elektrophoresen in reinen PAA-Gelen, 8 in PAA-Agarose-Gelen und drei mit Hilfe der radioaktiven Endmarkierung.

Eine Übersicht über die Herkunft der Stuhlproben, ihre Menge, über die angewandten Gele und den nach dem Lourenco-Schema ermittelten Elektropherotyp gibt die Tabelle 5.

Isolat-Nr.	Stuhl-Menge	Gel	Herkunft	Elektropherotyp
1	2 g	7 % PAA	München	Ib, IIb, IIIe, IV2
2	1,2 g	7 % PAA	Mailand	Ic, IIb, IIIe, IV2
3	1,77 g	7 % PAA	Stuttgart	Ic, IIb, IIIe, IV2
4	2 g	7 % PAA	München	Ic, IIb, IIIe, IV1
5	1,1 g	7 % PAA	Stuttgart	Ib, IIa, IIIe, IV2
6	0,45 g	PAA-Agarose	Stuttgart	Ib, IIa, IIIe, IV2
7	2,8 g	7 % Agarose	München	Ib, IIb, IIIe, IV2
8	2,1 g	7 % PAA	München	Ib, IIb, IIIf, IV2
9	1,4 g	7 % PAA	München	Ib, IIa, IIIe, IV2
10	1,7 g	5 % PAA	Mailand	Ib, IIb, IIIe, IV1
11	1,24 g	7 % PAA	München	Ic, IIb, IIIe, IV1

Tab. 6: Ermittelte Elektropherotypen (nach Lourenco)
(Fortsetzung Tab. 6 siehe S. 45)

Fortsetzung Tab. 6: Elektropherotypen (nach Lourenco)

Isolat-Nr.	Stuhlmenge	Gel	Herkunft	Elektropherotyp
12	0,9 g	5 % PAA	München	Ic,IIb,IIIe,IV2
13	1,61 g	PAA-Agarose	Stuttgart	Ib,IIa,IIIe,IV2
14	1,94 g	PAA-Agarose	Stuttgart	Ib,IIa,IIId,IV2
15	2 g	PAA-Agarose	München	Ib,IIa,IIIe,IV2
16	2,2 g	PAA-Agarose	München	Ib,IIa,IIIe,IV2
17	1,8 g	PAA-Agarose	München	Ib,IIb,IIIe,IV2
18	2,1 g	PAA-Agarose	München	Ic,IIa,IIIe,IV2
19	2,19 g	PAA-Agarose	München	Ib,IIa,IIIe,IV2
20	1,49 g	7 % PAA-label	München	Ib,IIa,IIIe,IV2
21	1,74 g	7 % PAA-label	München	Ib,IIa,IIIe,IV2
22	2 g	7 % PAA-label	München	Ib,IIa,IIIe,IV2

Die Klassifizierung der Elektropherotypen anhand des Schemas von Lourenco et al. ergibt, daß die 22 Isolate 8 verschiedenen Typen zugeordnet werden können. Die Tabelle 7 ordnet Elektropherotyp und Herkunft einander zu.

Elektropherotyp	Isolat und Herkunft
Ib,IIa,IIIe,IV2	Nr. 5 (Stgt), Nr. 6 (Stgt), Nr. 13 (Stgt) Nr. 9 (Mchn), Nr. 20 (Mchn), Nr. 21 (Mchn) Nr. 22 (Mchn)
Ib,IIb,IIIe,IV2	Nr. 1 (Mchn), Nr. 7 (Mchn), Nr. 15 (Mchn) Nr. 16 (Mchn), Nr. 17 (Mchn), Nr. 19 (Mchn)
Ic,IIb,IIIe,IV2	Nr. 2 (Mail), Nr. 3 (Stgt), Nr. 12 (Mchn)
Ib,IIb,IIIf,IV2	Nr. 8 (Mchn)
Ic,IIa,IIIe,IV2	Nr. 18 (Mchn)
Ib,IIa,IIId,IV2	Nr. 14 (Stgt)
Ic,IIb,IIIe,IV1	Nr. 4 (Mchn), Nr. 11 (Mchn)
Ib,IIb,IIIe,IV1	Nr. 10 (Mail)

Tab. 7: Herkunft der Elektropherotypen

Die Tabelle 7 läßt unter der Gesamtheit der Isolate zwei größere Gruppen desselben Typs erkennen. Der Elektropherotyp Ib, IIa,IIe,IV2 findet sich insgesamt sieben Mal, davon dreimal in Stuttgart und viermal in München. Der Elektropherotyp Ib,IIb,

IIIe, IV2 tritt sechs Mal auf, ausschließlich in München. Bei den anderen Genomprofilen handelt es sich um sporadische Typen.

Von den drei Isolaten mit einer kurzen Laufstrecke der Bahnen 10 und 11 wurde derselbe Typ zweimal in München isoliert und ein weiterer in Mailand. Der Anteil des short-type liegt damit bei ca. 14 % des Stichprobenumfangs.

E. Ergebnisse der Endmarkierungen

1. 5'-Endmarkierung

Die aus der Chromatographiesäule eluierten Fraktionen wurden wie beschrieben, hinsichtlich ihrer Radioaktivität in einem Szintillator untersucht. Die Abbildung 15 zeigt die Counts per Minute der einzelnen Fraktionen. Unter der Fraktionszahl ist das kumulierte Volumen des Eluats aufgetragen.

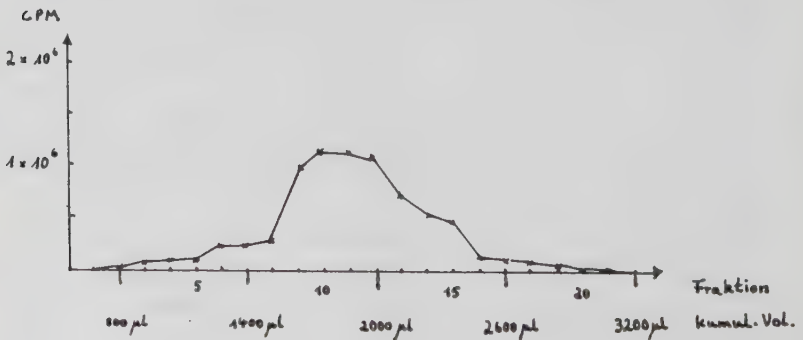


Abb. 15: Radioaktivität der eluierten Fraktionen.

In der Abbildung 15 ist ein Peak der Radioaktivität im Bereich der Banden 8 bis 12 zu sehen. Die Tatsache, daß bei Beginn der Elution der Fraktion 8 bereits 1640 µl Puffer durch die Säule gelaufen sind, spricht dafür, daß es sich

um kleine Moleküle mit einer langen Laufstrecke in der Agarose handeln muß. Große Moleküle würden sich als kleiner radioaktiver Peak in einer früheren Fraktion bemerkbar machen. Die abgebildete Verteilung der Radioaktivität läßt den Schluß zu, daß das ^{32}ATP als unverbrauchtes Substrat vorliegt. Auch die Elektrophorese in einem 7 % PAA-Gel mit anschließender Exposition auf einer Photoplatte zeigt keine radioaktiv markierten RNA-Segmente. Das Autoradiogramm ist in der Abbildung 16 wiedergegeben.

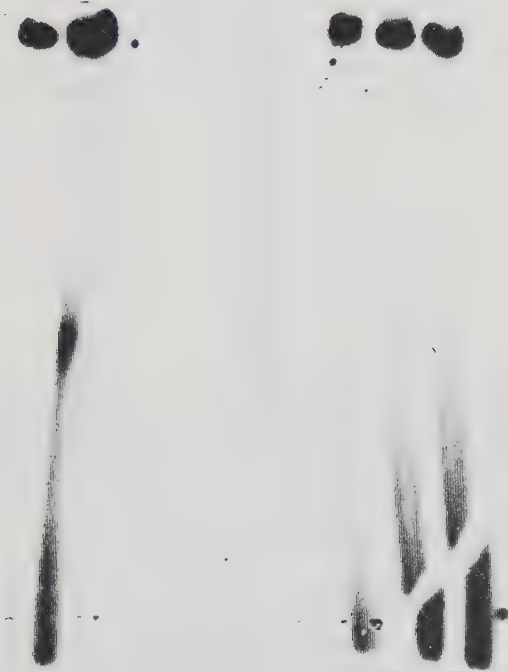


Abb. 16: Autoradiogramm

Abb. 17: Beschädigte RNA



Eine parallel dazu durchgeführte Silberfärbung der anderen Hälfte der radioaktiven Probe zeigt, daß sich in dem Enzym-Substrat-Gemisch noch RNA nachweisen läßt (Abbildung 17). Allerdings lassen die breiten, verwaschenen Banden darauf schließen, daß die RNA zum Teil beschädigt worden ist.

2. 3'-Endmarkierung

a. McCrae 1981

In der Säulenchromatographie wurden wiederum 22 Fraktionen ausgetropft, in denen sich kein eindeutiger zweiter Gipfel an Radioaktivität nachweisen ließ. Die Abbildung 18 zeigt die gezählten Counts per Minute der einzelnen Fraktionen.

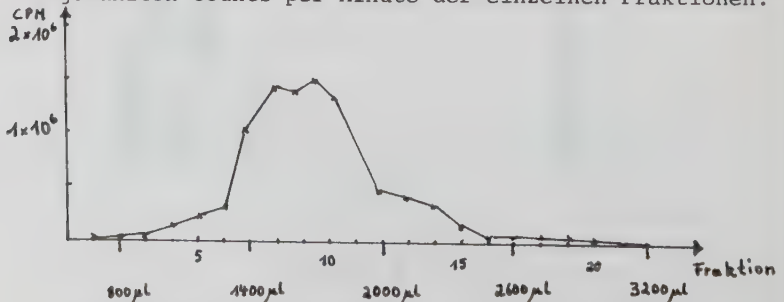


Abb. 18: Radioaktivität der eluierten Fraktionen

Das Autoradiogramm des 7 % PAA-Gels zeigt, daß trotzdem sehr geringe Mengen an markierter PNA entstanden sind (Abbildung 19)



Abb. 19: Autoradiogramm eines 7 % PAA-Gels mit 3'-end-markierter RV-RNA. Exposition 24 h bei -70°C

Es sind sehr undeutliche Banden im Bereich der Segmente 5-7, 7-9 und 10-11 zu erkennen. Verwertbare Aussagen hinsichtlich des Elektropherotyps sind jedoch nicht möglich.

Dasselbe PAA-Gel, das zur Herstellung des Autoradiogramms benutzt worden war, wurde anschließend mit der Silber-Natrium-

borhydrid-Methode angefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 rechts dargestellt. Da durch den Gefriervorgang und das anschließende Wiederauftauen das Gel beschädigt wird, ist der direkte Vergleich im identischen Gel nur bedingt möglich.

b. England et al., 1980

Trennt man RNA und ATP in der von England et al., 1980 beschriebenen Weise mit Zellulose, erhält man nur drei Fraktionen, so daß anhand einer Radioaktivitätsmessung nicht erkannt werden kann, ob endmarkierte RNA entstanden ist. Daher wurde in einem Fall das Reaktionsgemisch (50 µl) auf eine mit TSN-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 0,2 % SDS, 1 M NaCl) äquilibrierte 7 ml Sephadex G-50-Säule aufgetragen (Fa. Sigma, München). Nach Auftrag des Enzym-RNA-Gemischs wurden durch Zugaben von TSN-Puffer folgende Fraktionen eluiert:

Fraktion Nr. 0: 3 ml (verworfen)
Fraktion Nr. 1: 0,75 ml
Fraktion Nr. 2-15: je 0,75 ml

Von den Fraktionen 1 bis 15 wurden je 50 µl im Szintillator gemessen. Die Verteilung der Radioaktivität zeigt die Abbildung 20.

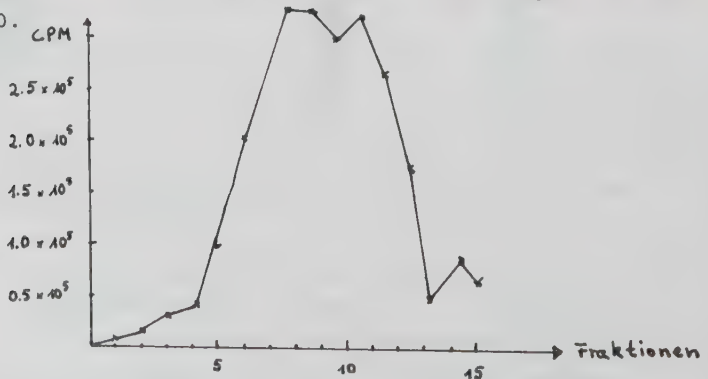


Abb. 20: Radioaktivität der durch eine Sephadex G-50-Säule getrennten Fraktionen

Aus der Sephadex G-50-Säule werden große Moleküle langsamer eluiert als kleine, daher ist radioaktiv markierte RNA als zweiter, kleiner Radioaktivitätsgipfel zu erwarten. Die in Abbildung 20 gezeigte Kurve weist einen solchen zweigipfeli-gen Verlauf auf.

Das spricht dafür, daß durch die Enzymreaktion 3'-endmarkier-te RNA entstanden ist.

Die Fraktionen 9 bis 12 wurden gepoolt und die darin enthal-tene RNA wie bereits beschrieben mit Äthanol und Natrium-acetat präzipitiert.

Die radioaktive RNA wurde in einem 7 % PAA-Gel getrennt. Pa-rallel zu diesem Gel mit der radioaktiv markierten RNA ein zweites 7 % PAA Gel, auf das nichtmarkierte RNA derselben Stuhlprobe aufgetragen wurde.

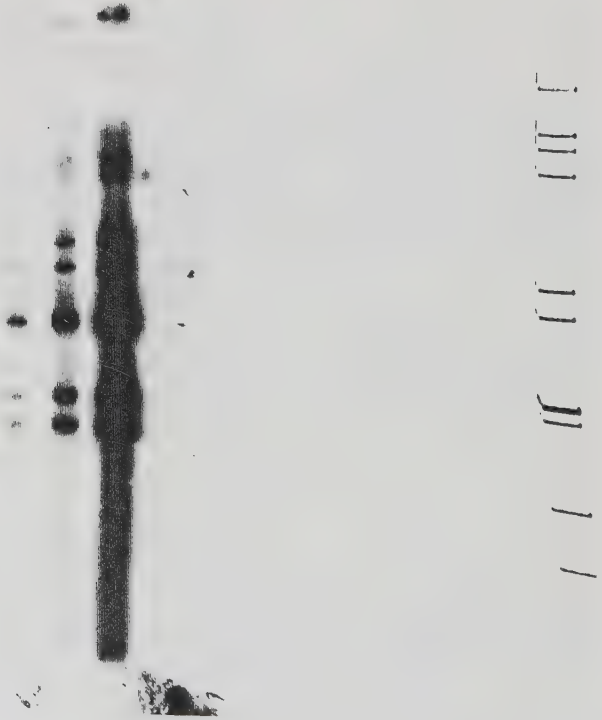


Abb. 21: Autoradiogramm eines 3'-endmarkierten RV-Genoms
Parallel dazu dasselbe Genom in Silberfärbung.

Die radioaktiv markierten Segmente lassen sich eindeutig voneinander unterscheiden, so daß eine Klassifizierung des Elektropherotyps möglich ist.

Da die Trennung der RNA vom radioaktiven Isotop mit Hilfe der Zellulose technisch weniger aufwendig ist, wurde bei

weiteren Versuchen die Sephadex-G-50-Säule nicht mehr benutzt.

Die Abbildung 22 zeigt ein Autoradiogramm nach 24 h Exposition bei -70°C . Die 3'-endmarkierte RNA wurde mit Zellulose gereinigt.

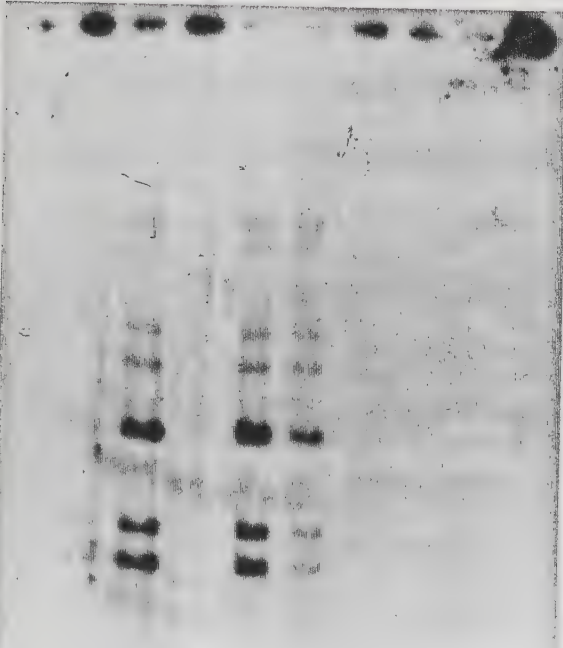


Abb. 22: Autoradiogramm eines 3'-endmarkierten RV-Genoms. 24 h Exposition bei -70°C . Trennung der RNA durch Zellulose. Die Segmente 1 bis 4 sind in der oberen Hälfte des Autoradiogramms nur ganz schwach zu erkennen.

Sowohl die Abbildung 22 wie auch die Abb. 21 zeigen, daß die großen RNA-Segmente 1 bis 4 wesentlich weniger gut markiert werden als die kleinen Moleküle 9 und 10. Um trotzdem eine Klassifizierung des Elektropherotype vornehmen zu können, muß daher eine Verdünnungsreihe aufgetragen werden. Die letzte erkennbare Verdünnungsstufe in Abb. 21 weist einen Titer von 1:2000 auf. Bei einer Gesamtmenge von ca. 20 µg isolierter RNA läßt sich errechnen, daß etwa 20 ng RNA zur Darstellung des gesamten Genoms ausreichend waren.

V. DISKUSSION

Die Diskussion der dargestellten Ergebnisse soll anhand der im Abschnitt "Ziel der Arbeit" vorgetragenen Problemstellungen geführt werden.

Zu 1.) Prüfung der Methoden zur RNA-Extraktion aus Stuhlproben hinsichtlich RNA-Ausbeute und Praktikabilität.

Sowohl die Prüfung anhand der letzten anfärbbaren Verdünnungsstufe im PAA-Gel sowie die Errechnung der isolierten Menge an RNA aus einem Absorptionsspektrum zeigen die Überlegenheit der Direktextraktion. Die Direktextraktion liefert wahrscheinlich mehr RNA als die konventionelle Extraktion aus gereinigten Viren (im Mittel 20,1 µg statt 12,25 µg RNA). Ein Vergleich des Arbeitsaufwandes fällt deutlich zugunsten der Direktextraktion aus. Die Extraktion aus gereinigten Viren nimmt mindestens vier Tage in Anspruch und erfordert in der Durchführung einiger Schritte große Übung. Das Herstellen der Schichtgradienten und das Absaugen der opaleszierenden, virushaltigen Fraktionen sind außerordentlich störanfällig. Demgegenüber dauert die Durchführung einer Direktextraktion nur etwa fünf Stunden und zusätzlich eine Nacht, in der die RNA präzipitieren kann. Dabei ist kein Schritt des Versuchsaufbaus zu kompliziert, um nicht auch in einem Routineverfahren mit großer Zuverlässigkeit ausgeführt werden zu können. Eine Erklärung für die höhere RNA-Ausbeute der Direktextraktion bieten die beiden folgenden Überlegungen.

Die RNA ist in der Bindung an die Zellulose vor dem Angriff durch RNAsen geschützt. Unspezifische RNAsen stellen in der Reinigung von RNA ein großes Problem dar, denn selbst eine nur geringe enzymatische Verdauung macht die Darstellung der Genomprofile wegen zu unscharfer Banden unmöglich, wie die Abbildung 17 zeigt.

Die Darstellung der RNA aus den gereinigten Viren ist zudem mit sehr vielen Verfahrensschritten verbunden. Neben stets möglichen Kontaminationen führt dies immer wieder zu geringen Probenverlusten, da die sehr klebrigen Nukleinsäuren

eine große Neigung zum Haften an Oberflächen besitzen. Diese beiden Überlegungen erklären, warum das technisch einfachere und schnellere Verfahren auch das bessere ist. Aus den dargestellten Ergebnissen wurde der Schluß gezogen, zur Differenzierung der RV-Genome das Verfahren nach Theil et al., 1981 zu benutzen. Die Methode zur Virusreinigung besitzt aber weiterhin ihre Bedeutung für die Elektronenmikroskopie.

Die Durchsicht der neueren Literatur bestätigt diesen Schluß. In den meisten Untersuchungen der Elektropherotypen von Rotaviren nach 1982 wurden Verfahren verwendet, die ohne die Darstellung einer hochgereinigten Virusfraktion auskommen (Herring et al., 1982, Clarke and McCrae, 1982, Rodriguez et al., 1983, Follet et al., 1983, Mata et al., 1983 und Dolan et al., 1985).

Zu 2.) Prüfung verschiedener Gelsysteme hinsichtlich Praktikabilität und Trennschärfe.

Harnstoff-Agarose-Mischgele wurden wegen der dargestellten schlechten Ergebnisse nicht weiter benutzt. Die Denaturierung der RNA scheint der sauberen Trennung der Segmente im Wege zu stehen. Zudem ist die praktische Handhabung dieses Gels schwieriger als die der PAA-Gele.

In der Literatur findet sich nur eine einzige Arbeit, die ein denaturierendes Gel zur Trennung des RV-Genoms beschreibt. Da die Autoren bei der damit durchgeführten Größenbestimmung der RNA-Segmente zu anderen Resultaten kommen als alle anderen Arbeiten, ist zu vermuten, daß auch diese Einzelangabe mit einer unzuverlässigen Methodik erarbeitet wurde (Morimoto et al., 1978).

Dagegen benutzen einige Autoren das Polyacrylamid-Agarose-Mischgel (Kalica, 1978 und Todd und McNulty, 1976). Trotz der dargestellten guten Trennschärfe eignet es sich nicht besonders gut als routinemäßiges Verfahren.

Die Herstellung ist komplizierter als die des reinen PAA-Gels. Fehler entstehen insbesondere dann, wenn die Agarose nicht sorgfältig genug aufgekocht und mit dem PAA vermischt wird.

Gelegentlich zeigen die RNA-Banden nach der Elektrophorese einen wellenförmigen Verlauf, wodurch die Inhomogenitäten des Gels sichtbar werden.

Für Silberfärbungen ist das Gel nicht so gut geeignet wie das reine PAA-Gel. Da die Silberionen die Agarose des Gels mit anfärben, ergibt sich ein schlechterer Kontrast, der die Empfindlichkeit der Färbung mindert (Goldman and Merrill, 1983). In der Arbeit von Kalica et al., 1978 wird daher auch nur die Ethidiumbromidfärbung benutzt.

Dieser Nachteil wird durch die Verwendung eines reinen PAA-Gels vermieden. Hinzu kommen eine sehr gute Trennschärfe, einfache technische Handhabung und geringe Herstellungskosten.

Es wurde daher der Schluß gezogen, daß für die routinemäßige Anwendung das reine PAA-Gel am geeignetsten ist. Die Literatur dokumentiert die weite Anwendung dieses Verfahrens (Lourenco et al., 1981, Clarke and McCrae, 1982, Albert et al., 1982, Espejo et al., 1981, Dolan et al., 1985 und viele andere). In einigen Fällen wurde ein 5 % PAA-Gel benutzt. Wie die Abbildung 11 zeigt, ergeben sich ebenfalls gute Gnomdarstellungen. In der Literatur finden sich viele weitere Konzentrationsangaben, aus Gründen der Standardisierung empfiehlt es sich jedoch, nicht mit wechselnden Konzentrationen zu arbeiten.

Auch der Zusatz eines Inhibitors für RNAsen, der gelegentlich angegeben wird, bringt keinen Vorteil. Der größte Teil der hier vorgestellten Elektrophoresen wurde ohne Polyvinylsulfat durchgeführt. Es kann daher ohne Qualitätsverlust auf diese karzinogene Substanz verzichtet werden.

Zu 3.) Vergleich verschiedener Methoden zur Anfärbung der RNA

Die beiden durchgeführten Vergleiche zwischen der Silberfärbung und Ethidiumbromid zeigen die Überlegenheit der Silbermethode. Die Nachweisempfindlichkeit ist etwa um den Faktor 10 größer.

Daraus wurde der Schluß gezogen, daß in Fällen, in denen es

auf eine möglichst große Sensitivität ankommt, die Silberfärbung durchgeführt werden sollte.

Die Ethidiumbromidfärbung besticht jedoch durch ihre technische Einfachheit. Daher behält sie als schnelle Routinemethode ihren Wert. Selbst in neueren Arbeiten wird sie noch benutzt (Rodriguez et al., 1983, Chiba et al., 1984 und Hoshino et al., 1985). Allerdings ist auch hier zu bedenken, daß Ethidiumbromid karzinogene Eigenschaften hat (vgl. Goldman und Merrill, 1983).

Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen der Silberfärbung mit Natriumborhydrid und Kaliumdichromat zeigen eine etwa 10fach höhere Empfindlichkeit der Natriumborhydridmethode. Da sich beide Verfahren hinsichtlich der Praktikabilität kaum unterscheiden, wurde die Silber-Kaliumdichromat-Färbung für weitere Gele nicht mehr benutzt. In der durchgesehenen Literatur findet sich auch keine Arbeit, die die Anwendung dieser Färbung beschreibt.

Der Vergleich zwischen der Silberfärbung mit Natriumborhydrid und mit Benzotriazol läßt keine eindeutige Überlegenheit einer der beiden Verfahren erkennen. Die Anfärbung mit der Benzotriazolmethode gelingt in zwei Fällen eine Titerstufe weiter (1:100 gegenüber 1:50) als mit Natriumborhydrid, im dritten Fall sind die Verhältnisse umgekehrt. Methodisch erscheint dieser Unterschied zu unsicher, um daraus zu einer sicheren Aussage zu gelangen.

Es wird daher der Schluß gezogen, daß sich beide Färbemethoden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit nicht wesentlich unterscheiden. Da jedoch die Färbung mit Benzotriazol Nachteile bei der praktischen Durchführung aufweist - sie erfordert z.B. ein Photolabor - wurden die meisten Silberfärbungen mit Natriumborhydrid durchgeführt.

Der genaue Mechanismus, wie es zur Anfärbung von Nukleinsäuren durch Silberionen kommt, ist noch immer ungeklärt. Besonders gut werden doppelsträngige Nukleinsäuren bis zu einer Größe von 300 Basenpaaren gefärbt (Goldman und Merrill, 1983).

Diese Eigenschaft ist der Grund für die hohe Empfindlichkeit besonders bei den kleinen dsRNA Banden der Rotaviren.

Zu 4.) Epidemiologischer Überblick über die ermittelten Elektropherotypen. Versuch einer Bewertung.

Die Klassifizierung der Viren nach dem Lourenco-Schema ergab, daß der Elektropherotyp Ib,IIa,IIIe,IV2 insgesamt sieben Mal und der Typ Ib,IIb,IIIe,IV2 insgesamt sechs mal identifiziert werden konnte.

Die epidemiologische Auswertung muß vorbehaltlich des Ergebnisses von Clarke und McCrae, 1982 erfolgen, daß Genom-Segmente mit identischen Migrationsverhalten in der Elektrophorese unterschiedliche Nukleotidsequenzen besitzen können. Deshalb erlaubt die Feststellung identischer Elektropherotypen allein noch nicht den Schluß, daß es sich um dieselben Viren handelt.

Durch kontrollierte Verdauung mit spezifischen Nukleasen und Vergleich der dabei entstandenen Oligonukleotide ("fingerprinting technique") konnten Pedley et al., 1983 auch noch sehr feine Unterschiede der Nukleotidsequenzen nachweisen. Allerdings macht ein enger zeitlicher und örtlicher Zusammenhang der Infektionen bei gleichem Elektropherotyp die Identität der Viren außerordentlich wahrscheinlich. Zurückhaltung ist dagegen beim Typ Ic,IIb,IIIe,IV2 geboten, der je einmal in München, Stuttgart und Mailand isoliert wurde. Es erscheint zumindest fraglich, ob es sich wirklich um einen identischen Typ handelt.

Der Typ Ib,IIb,IIIe,IV2 wurde insgesamt sechs Mal in derselben Klinik (Poliklinik München) im Zeitraum vom Dezember 1982 bis April 1983 gefunden. Ein weiterer Typ (Ib,IIa,IIIe,IV2) trat vier Mal in dieser Klinik auf.

Einen Überblick über die ermittelten Typen in der Poliklinik München gibt die Tabelle 7.

Isolationsort	Elektropherotyp	Zahl der Isolate
Poliklinik München	Ib, IIb, IIIe, IV2	6
	Ib, IIa, IIIe, IV2	4
	Ic, IIb, IIIe, IV1	2
	Ic, IIb, IIIe, IV2	1
	Ib, IIb, IIIf, IV2	1
	Ic, IIa, IIIe, IV2	1

Tab. 7: Elektropherotypen in der Poliklinik München

Die Tabelle 7 zeigt, daß zwei Elektropherotypen in der Poliklinik über einen Zeitraum von vier Monaten nachweisbar waren.

Die Ausscheidung von Rotaviren mit dem Stuhl übersteigt nur ausnahmsweise zwei Wochen. Es läßt sich anhand der Ergebnisse nicht entscheiden, ob diese beiden Typen immer wieder von neuem in die Klinik hineingetragen worden sind, oder ob sie Infektionsketten innerhalb der Klinik gebildet haben. Da aber die Möglichkeit der Übertragung durch Erwachsene bekannt ist, erscheint es denkbar, daß die Viren sich durch inapparente Infektion des Personals und Reinfektionen der Kinder dauerhaft halten können. Eine Untersuchung von Stuhlproben des Personals auf Rotaviren könnte darüber Auskunft geben. Die weiteren vier Typen (siehe Tabelle 7) treten nur sporadisch auf.

Die Zahl von insgesamt sechs verschiedenen Typen bei nur 16 Isolaten aus der Poliklinik erscheint vergleichsweise sehr hoch (Lourenco et al., 1981 finden 29 bei 110 Isolaten). Eine Erklärung dafür bietet die hohe Patientenfluktuation in der Poliklinik, wodurch besonders in den Wintermonaten immer wieder neue Typen eingeschleppt werden. Ein sehr interessanter Vergleich ergibt sich mit der von Nicolas et al., 1984 veröffentlichten, französischen Studie. Die Autoren weisen nach, daß an Kliniken mit hoher Patientenfluktuation wesentlich mehr Elektropherotypen isoliert werden können als sonst üblich. Auch sie finden unter den vielen verschiedenen Typen zwei, die häufiger auftreten und kleine Infektions-

ketten bilden. Ein Typ ist über 3 Monate lang nachweisbar, wobei nicht entschieden werden kann, auf welche Weise sich das Virus in der Klinik hält.

Neben der Überwachung des Personals hinsichtlich inapparenter Infektionen kann daraus der Schluß gezogen werden, daß Patienten mit banalen Durchfallerkrankungen möglichst nicht stationär aufgenommen werden sollten. Die Untersuchungen von Yolken et al., 1982 und Yolken 1984 zeigen, daß immundefiziente Patienten durch nosokomial erworbene RV-Infektionen vital gefährdet werden können. Daher ist auch erhöhte Vorsicht geboten, wenn Kinder mit Durchfallerkrankungen auf Intensivpflegestationen verlegt werden.

Unter den fünf Isolaten aus Stuttgart ließen sich drei Elektropherotypen isolieren. Die drei Isolate des Typs Ib,IIa,IIIe,IV2 bilden wahrscheinlich ebenfalls eine kleine Infektionskette, obwohl der zeitliche Zusammenhang nicht mehr festgestellt werden kann. Ob diese Viren mit den vier Isolaten aus München identisch sind, läßt sich nicht mit Sicherheit entscheiden.

Insgesamt wiesen drei von 22 Isolaten (13,6 %) eine kurze Laufstrecke der Segmente 10 und 11 auf. Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (Espejo et al., 1977, Yolken et al., 1978, Naguib et al., 1984 und White et al., 1984).

Zwei dieser drei "short"-Typen ließen sich demselben Elektropherotyp zuordnen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß es sich um ein identisches Virus handelt.

Die Tatsache, daß der dritte "short"-Typ ein anderes Genomprofil aufweist, zeigt, daß auch der Serotyp 1 eine ganze Gruppe verschiedener Elektropherotypen umfaßt.

"Medicine is an ever changing science". Nach Abschluß der vorliegenden Versuchsreihen wurden Arbeiten über Rotaviren mit neuen Eigenschaften publiziert.

Diese von Rodger et al., 1982 als RVLA ("rotavirus-like agent") und Nicolas et al., 1983 als "Pararotaviren" bezeichneten Erreger unterscheiden sich morphologisch nicht von den typischen Rotaviren. Wegen der relativ gleichmäßigen Verteilung der 11 RNA Banden in der Elektrophorese

(Eiden et al., 1985), sind sie nicht nach dem Lourence-Schema einteilbar. Das ihnen fehlende Gruppenantigen (VP 6) erklärt die schlechte Nachweisbarkeit in den herkömmlichen ELISA. Tao et al., 1984 finden nur 2 unter 45 Pararotavirusisolaten mit positiven ELISA-Ergebnissen. Daher wären diese Viren in den hier vorgestellten Versuchen mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Nachweis entgangen.

Die Bedeutung dieser neuen Erreger ist noch nicht endgültig geklärt. Sie scheinen jedoch besonders Erwachseneninfektionen hervorzurufen (Tao et al., 1983 und 1984, Eiden et al., 1985).

Zu 5.) Durchführung einer radioaktiven Endmarkierung

Mit drei verschiedenen Methoden wurde versucht, die RNA an einem der beiden Enden radioaktiv zu markieren. Als Ergebnis läßt sich zusammenfassen.

Es ist nicht gelungen, die RNA am 5'-Ende mit ^{32}ATP zu markieren.

Die Markierung nach McCrae, 1981 am 3'-Ende mit ^{32}pCp ist prinzipiell möglich, liefert aber nur sehr geringe Menge an markierter RNA.

Das Markierungsverfahren nach England und Uhlenbeck, 1980 erwies sich als praktikable und hochsensitive Methode.

In der Literatur findet sich weder ein Beispiel einer gelungenen 5'-Endmarkierung bei Rotaviren noch eine Antwort auf die Frage, warum diese nicht möglich ist. Aus der Arbeit von Mitsunobu et al., 1983 geht hervor, daß die 5'-Enden von Reoviren ein m^7G -Cap besitzen. Diese Erklärungsmöglichkeit trifft jedoch für Rotaviren nicht zu, da die Aufklärung zweier Nukleotidsequenzen der Segmente 9 und 10 (Okada et al., 1984 und Richardson et al., 1984) Cap-freie 5'-Enden ergeben hat.

Das Ergebnis der Markierung nach McCrae ist angesichts des hohen Einsatzes an RNA, radioaktivem Isotop und Enzym insgesamt als unbefriedigend zu werden. Die beschriebenen Versuchsbedingungen sind zur Markierung von Reoviren angewandt worden. Da diese Viren in Zellkulturen züchtbar sind, steht

auch die RNA in viel größerer Menge zur Verfügung. Daher stellt sich das Problem der geringen Affinität der T_4 -RNA-Ligase nicht.

Für die geringen Mengen an RNA, die sich aus einer Stuhlprobe extrahieren lassen, erweisen sich daher die Reaktionsbedingungen von England und Uhlenbeck als viel günstiger.

Die 3'-Endmarkierung nach dieser Methode liefert differenzierbare Genomprofile bis zu einer Verdünnung der RNA von 1:2000. Gegenüber der Silberfärbung wird damit die Nachweisgrenze nochmals um den Faktor 10 gesenkt.

Übereinstimmend mit den Ausführungen von England und Uhlenbeck werden große RNA-Segmente schlechter markiert als kleine. Daher findet sich in den Abbildungen 21 und 22 die meiste Radioaktivität im Bereich der Segmente 7 bis 11.

Durch den großen Unterschied wird zur genauen Klassifizierung des Genoms eine Verdünnungsreihe nötig. In der hohen Konzentration können dann die großen Banden eingeordnet werden, in der kleinen die unteren Segmente.

Diese technische Schwierigkeit und der hohe Aufwand schließen die Anwendung der Endmarkierung zur routinemäßigen Ermittlung des Elektropherotyps aus. Auch die Gefahr im Umgang mit Phosphor-32 rechtfertigt den Einsatz nicht. Die Bedeutung dieses Verfahrens liegt vielmehr darin, daß man im molekularbiologischen Umgang mit RNA, etwa beim Klonieren der viralen Gene, extrem empfindliche Verfahren braucht, um die einzelnen RNA-Segmente nachweisen zu können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Versuche durchgeführt mit dem Ziel, ein möglichst praktikables und empfindliches Verfahren zur Darstellung und Klassifizierung von RV-Genomen zu ermitteln. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- 1.) Die von Theil et al., 1981 beschriebene Methode zur direkten Extraktion der RNA aus den Stuhlproben erwies sich als zuverlässiges und technisch einfaches Verfahren, das pro Gramm Stuhl etwa 10 µg RNA liefert.
- 2.) Das Elektrophoresesystem von Peacock und Dingman, 1967 in 7 % Polyacrylamid erwies sich als das beste und einfachste Verfahren.
- 3.) Die besten Ergebnisse der Silberfärbungen, bis zu einer Nachweisgrenze von 0,2 µg RNA, erzielte eine von Sammons et al., 1981 beschriebene Methode. Die technisch einfachste Färbung bei geringerer Empfindlichkeit wird mit Ethidiumbromid durchgeführt.
- 4.) Die epidemiologische Auswertung der untersuchten Stuhlproben ergab, daß mindestens zwei Elektropherotypen im Winter 1982/83 in der Poliklinik München endemisch waren. Weitere sporadische Typen konnten differenziert werden.
- 5.) Der Anteil der Typen mit einer kurzen Migrationsstrecke der Segmente 10 und 11 betrug ca. 14 %.
- 6.) Aus nicht geklärten Gründen gelang es nicht, die RNA-Segmente am 5'-Ende mit ³²ATP und dem Enzym PNK zu markieren.
- 7.) Erfolgreiche Endmarkierungen am 3'-Ende wurden in dem von England und Uhlenbeck, 1980 beschriebenen Versuchsansatz durchgeführt. Dabei reichten 20 ng endmarkierter RNA zur Differenzierung des Genomprofils aus.

Insgesamt überprüft die Arbeit die methodische Grundlage zur Differenzierung der Elektropherotypen bei Rotaviren, sowie ein Verfahren zur radioaktiven Markierung ihrer RNA-Segmente.

VII. LITERATUR

- ALBERT MJ, SOENARTO Y, BISHOP RF (1982) Epidemiology of rotavirus diarrhea in Yogyakarta, Indonesia, as revealed by electrophoresis of genome RNA. *J Clin Microbiol* 16: 731-733
- ALBERT MJ, BISHOP RF, SHANN FA (1983) Epidemiology of rotavirus diarrhea in the highlands of Papua, New Guinea, in 1979, as revealed by electrophoresis of genome RNA. *J Clin Microbiol* 17: 162-164
- BANATVALA JE, CHRYSTIE IL (1978) Rotaviral infections in human neonates. *J Am Vet Med Assoc* 173: 527-530
- BEARDS GM (1982a) A method for the purification of rotaviruses and adenoviruses from faeces. *J Virol Meth* 4: 343-352
- BEARDS GM (1982b) Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. *Arch Virol* 74: 65-70
- BEARDS GM, CAMPBELL AD, COTTRELL NR, PEIRIS JS, REES N, SANDERS RC, SHIRLEY JA, WOOD HC, FLEWETT TH (1984) Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J Clin Microbiol* 19: 248-254
- BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ (1973) Virus particles in the epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283
- BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ (1974) Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1: 149-151
- BISHOP RF, BARNES GL, CIPRIANI E, LUND JS (1983) Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *NEJM* 309: 72-76
- BISHOP RF, CIPRIANI E, LUND JS, BARNES GL, HOSKING CS (1984) Estimation of rotavirus IgG antibodies in human serum samples by ELISA. *J Clin Microbiol* 19: 447-452
- BLACK RE, MERSON MH, RAHMAN ASMM, YUNUS M, ALIM ARMA, HUQ I, YOLKEN RH, CURLIN GT (1980) A two-year study of bacterial, viral, and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis* 142: 660-664

- BLACK RE, MERSON MH, HUQ I, ALIM ARMA, YUNUS MD (1981) Incidence and severity of rotavirus and Escherichia coli diarrhea in rural Bangladesh. *Lancet* 1: 141-143
- BLACKLOW NR, CUKOR G (1981) Viral gastroenteritis (review). *N Engl J Med* 304: 397-406
- BOHL EH, THEIL KW, SAIF LJ (1984) Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenetic comparison with other rotaviruses. *J Clin Microbiol* 19: 105-111
- BOULIKAS T, HANCOCK R (1981) A highly sensitive technique for staining DNA and RNA in polyacrylamide gels using silver. *J Biochem Biophys Meth* 5: 219-228
- BRANDT CD, KIM HW, RODRIGUEZ WJ, ARROBIO JO, JEFFRIES BC, PARROT RH (1982) Rotavirus gastroenteritis and weather. *J Clin Microbiol* 16: 478-482
- BRUCE AG, UHLENBECK OC (1978) *Nucleic Acids Research* 5: 3665-3677
- BRYDEN AS, THOULESS ME, HALL CJ, FLEWETT TH, WHARTON BA, MATHEW PM, CRAIG I (1982) Rotavirus infections in a specialcare baby unit. *J Infect* 4: 43-48
- CHAMPSAUR H, QUESTINAUX E, PREVOT J, HENRY-AMAR M, GOLDSMITH D, BOURJOUANE M, BACH C (1984a) Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two years of life. I. Virus shedding. *J Infect Dis* 149: 667-674
- CHAMPSAUR H, HENRY-AMAR M, GOLDSZMITH D, PREVOT J, BOURJOUANE M, QUESTINAUX E, BACH C, (1984b) Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two years of life. II. Serological response. *J Infect Dis* 149: 675-682
- CHIBA Y, MIYAZAKI C, MAKINO Y, MUTANDA LN, KIBUE A, LICHENGA EO, TUKEI PM (1984) Rotavirus infection in two districts of Kenya from 1982-83 as analysed by electrophoresis of genomic RNA. *J Clin Microbiol* 19: 579-582
- CHIRGWIN JH, PRZYBYLA AE, MACDONALD RJ, RUTTER WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem* 18: 5294-5299
- CLARKE IN, McCRAE MA (1982) Structural analysis of electrophoretic variation in the genome profiles of rotavirus field isolates. *Infect Immun* 36: 492-497

- CREWE E, MURPHY AM (1980) Further studies on neonatal rotavirus infections. *M J Aust* 1: 61-63
- CUKOR G, BLACKLOW NR (1984) Human viral gastroenteritis. *Microbiol Rev* 48: 157-179
- CUKOR G, PERRON DM, HUDSON R, BLACKLOW NR (1984b) Detection of rotavirus in human stools by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 19: 888-892
- DAVIDSON GP, BUTLER DG, GALL DG, et al. (1977) Ion transport in enteritis caused by human rotavirus. American Society of Microbiol Ann Meeting. Washington DC, May 1977
- DOLAN KT, TWIST EM, HORTON-SLIGHT P, FORRER C, BELL LM, PLOTKIN SA, CLARK HF (1985) Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *J Clin Microbiol* 21: 753-58
- DuPONT HL (1984) Rotaviral gastroenteritis - some recent developments. *J Infect Dis* 149: 663-66
- EBINA T, SATO A, UMEZU K, ISHIDA N, OHYAMA S, OHIZUMI A, AIKAWA K, KATAGIRI S, KATSUSHIMA N, IMAI A, KITAOKA S, SUZUKI H, KONNO T (1984) Prevention of rotavirus infection by cow colostrum containing antibody against human rotavirus. *Lancet* 2: 1029-1030
- ECHEVERRIA P, RAMIREZ G, BLACKLOW NR, KŞIAZEK T, CUKOR G, CROSS JH (1979) Travellers' diarrhea among U.S. army troops in South Korea. *J Infect Dis* 139: 215-219
- EIDEN J, VONDERFECHT S, YOLKEN RH (1985) Evidence that a novel rotavirus-like agent of rats can cause gastroenteritis in man. *Lancet*, July 1985: 8-10
- ENGLAND TE, GUMPORT RI, UHLENBECK OC (1977) Dinucleoside pyrophosphates are substrates for T_4 -induced RNA ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4839-4842
- ENGLAND TE, UHLENBECK OC (1978) 3'-terminal labelling of RNA with T_4 ligase. *Nature* 275: 560-561
- ENGLAND TE, BRUCE AG, UHLENBECK OC (1980) Specific labelling of 3' termini of RNA with T_4 RNA ligase. *Meth Enzymol* 65: 65-74
- ERICSON BL, GRAHAM DY, MASON BB, ESTES MK (1982) Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA 11 polypeptides in infected cells. *J Virol* 42: 825-839

- ESPEJO RT, CALDERON E, GONZALEZ N (1977) Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 5: 502-506
- ESPEJO RT, CALDERON E, GONZALEZ N, SALOMON A, MARTUSCELLI A, ROMERO P (1979) Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City, 1977. *J Infect Dis* 139: 474-477
- ESPEJO RT, MUNOZ O, SERAFIN F, ROMERO P (1980a) Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. *Infect Immun* 27: 351-354
- ESPEJO RT, MARTINEZ E, LOPEZ S, MUNOZ O (1980b) Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect Immun* 28: 323-337
- ESPEJO RT, LOPEZ S, ARIAS C (1981) Structural polypeptides of Simian Rotavirus SA 11 and the effect of trypsin. *J Virol* 37: 156-160
- ESTES MK, PALMER EL, OBIJESKI JF (1983) Rotaviruses: A review. In: Current topics in microbiology and immunology 105. Edts: COOPER M, HOFSCHEIDER PH, KOPROWSKI H et al. Springer, Berlin 1983
- FAULKNER-VALLE GP, CLAYTON AV, McCRAE MA (1983) Molecular biology of rotavirus. III. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of bovine rotavirus. *J Virol* 42: 669-677
- FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H (1973) Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2: 1497
- FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H, WOODE GN, BRIDGER JC, DERRICK JM (1974) Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2: 61-63
- FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES HA, MORRIS CA (1975) Epidemic viral enteritis on a long stay children's ward. *Lancet* 1: 4-6
- FLEWETT TH, WOODE GN (1978) The rotaviruses. *Arch Virol* 57: 1-23
- FLEWETT TH (1982) Clinical features of rotavirus. In: Virus infections of the gastrointestinal tract. Eds: TYRELL DAJ, KAPIKIAN AZ, New York 1982, p 124-145

- FLORES J, PEREZ I, WHITE L, PEREZ M, KALICA A, MARQUINA R, WYATT RG, KAPIKIAN AZ, CHANNOCK RM (1982) Genetic relatedness among HRV as determined by RNA hybridization. *Infect Immun* 37: 648-655
- FOLLETT EAC, DESSELBERGER U (1983) Cocirculation of different rotavirus strains in a local outbreak of infantile gastroenteritis: monitoring by rapid and sensitive nucleic acid analysis. *J Med Virol* 11: 39-52
- GERNA G, PASSARANI N, BATTAGLIA M, PARCIVALLE E (1984) Rapid serotyping of HRV strains by solid-phase immune electron microscopy. *J Clin Microbiol* 19: 273-278
- GOLDMAN D, MERRIL CR (1982) Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis* 3: 24-26
- GOUVEA VS, SCHNITZLER TJ (1982) Polymorphism of the migration of double-stranded RNA genome segments of avian rotaviruses. *J Virol* 43: 465-471
- GRAUBALLE PC, JARZABEK Z (1984) Comparison of indirect double antibody and double antibody sandwich ELISA techniques with latex agglutination test for the diagnosis of human rotavirus infections. *Acta Virol* 28: 59-63
- GREENBERG HB, KALICA AR, WYATT RG, et al. (1980) Rescue of noncultivable human rotavirus by gene measurement during mixed infection with CS mutants of a cultivatable bovine rotavirus. *Proc Natl Acad Sci* 78: 420-424
- GREENBERG HB, McAULIFFE V, VALDESUSO J, WYATT RG, FLORES J, KALICA A, HOSHINO Y, SINGH N (1983a) Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39: 91-99
- GREENBERG HB, VALDESUSO J, VanWYKE K, MIDTHUN K, WALSH M, McAULIFFE V, WYATT RG, KALICA AR, FLORES J, HOSHINO Y (1983b) Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol* 47: 267-275

- GUERRANT RL, KIRCHHOFF LV, SHIELDS DS, NATIONS MK, LESLIE J, deSOUZA MA, ARANJO JG, CORREIA LL, SAUER KT, McCLELLAND KE, TROWBRIDGE FL, HUGHES JM (1983) Prospective study of diarrheal diseases in northeastern Brazil: Patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. *I Infect Dis* 148: 986-97
- GURWITH M, WENMAN W, HINDE D, FELTHAM S, GREENBERG HB (1981) A prospective study of rotavirus infections in infants and young children. *I Infect Dis* 144: 218-224
- GURWITH M, WENMAN W, GURWITH D, BRUNTON J, FELTHAM S, GREENBERG HB (1983) Diarrhea among infants and young children in Canada: A longitudinal study in three northern communities. *J Infect Dis* 147: 685-691
- HAIKALA OJ, KOKKONEN JO, LEIONEN MK, NURMI T, MÄNTYJÄRVI R, SARKINEN HK (1983) Rapid detection of rotavirus in stool by latex agglutination. *J Med Virol* 11: 91-97
- HERRING AJ, INGLIS NF, OJEH CK, SNODGRASS DR, MENZIES JD (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16: 473-477
- HILDRETH C, THOMAS M, RIDGWAY GL (1981) Rotavirus infection in an obstetric unit. *Br Med J* 282: 231
- HODES HL (1977) Viral gastroenteritis (marginal comments). *Am J Dis Child* 131: 729-731
- HOLMES IH (1983) Rotaviruses. In: *The reoviridae*. Ed: JOLIK WK Plenum Publishing Corp, New York, p 359-423
- HOSHINO Y, WYATT RG, GREENBERG HB, FLORES J, KAPIKIAN AZ (1984) Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J Infect Dis* 149: 694-702
- HOSHINO Y, WYATT RG, FLORES J, MIDTHUN K, KAPIKIAN AZ (1985) Serotypic characterization of rotaviruses derived from asymptomatic human neonatal infections. *J Clin Microbiol* 21: 425-430
- HRDY DB, ROSEN L, FIELDS BN (1979) Polymorphism of the migration of double-stranded RNA genome segments of reovirus isolates from humans, cattle, and mice. *J Virol* 31: 104-

- HRUSKA J, NOTTER M, MAREYUS M, et al. (1978) RNA polymerase associated with human rotaviruses in diarrheal stools. J Virol 544-546
- HUGHES JH, TOUMARI AV, MANN DR, HAMPARIAN VV (1984) Latex immunoassay for rapid detection of rotavirus. J Clin Microbiol 20: 441-447
- INOUE S, MATSUNO S, YAMAGUCHI H (1984) Efficient coating of the solid phase with RV antigens for ELISA of IgA antibody in faeces. J Clin Microbiol 19: 259-63
- KALICA AR, GARON CF, WYATT RG, MEBUS CA, Van KIRK DH, CHANOCK RM, KAPIKIAN AZ (1976) Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. Virol 74: 86-92
- KALICA AR, SERENO MM, WYATT RG, MEBUS CA, CHANOCK RM, KAPIKIAN AZ (1978) Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. Virol 87: 247-55
- KALICA AR, GREENBERG HB, ESPEJO RT, FLORES J, WYATT RG, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM (1981a) Distinctive ribonucleic acid patterns of HRV subgroups 1 and 2. Infect Immun 33: 958-961
- KALICA AR, GREENBERG HB, WYATT RG, FLORES J, SERENO MM, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM (1981b) Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. Virol 112: 385-390
- KAPIKIAN AZ, KALICA AR, SHIH JW, CLINE WL, THORNHILL TS, WYATT RG, CHANOCK RM, KIM HW, GERIN JL (1976a) Buoyant density in caesium chloride of the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis by ultracentrifugation, electron microscopy, and complement-fixation. Virol 70: 564-69
- KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG (1976b) Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. NEJM 294: 965-72

- KAPIKIAN AZ, GREENBERG HB, KALICA AR, WYATT RG, KIM HW, BRANDT CD, RODRIGUEZ WJ, FLORES J, SINGH N, PARROTT RH, CHANNOCK RM (1981) New developments in viral gastroenteritis. In: Acute enteric infections in children. Eds: HOLME T, HOLMGREN J, MERSON MH, MOLLBY R. Elsevier, North Holland Biomedical, Amsterdam 1981. p 9-57
- KAPIKIAN AZ, YOLKEN RH (1985) Rotavirus. In: Principles and practice of infectious diseases. Eds: MANDELL GL, DOUGLAS RT, BENNETT JE. New York 1985. p 933-44
- KESWICK BH, BLACKLOW NR, CUKOR GC, DuPONT HL, VOLLET JL (1982) Norwalk virus and rotavirus in travellers' diarrhoea in Mexico. *Lancet*: 109-110
- KONNO T, SATO T, SUZUKI H, KITAOKA S, KATSUSHIMA N, SAKAMOTO M, YAZAKI N, ISHIDA N (1984) Changing RNA patterns in rotaviruses of human origin: demonstration of a single dominant pattern at the start of an epidemic and various patterns thereafter. *J Infect Dis* 149: 683-87
- KOOPMAN JS, TURKISH VJ, MONTO AS, GOUVEA V, SRIVASTAVA S, ISAACSON RE (1984) Patterns and etiology of diarrhea in three clinical settings. *Am J Epidemiol* 119: 114-23
- KRAUSE PJ, HYAMS JS, MIDDLETON PJ, HERSON VC, FLORES J (1983) Unreliability of rotavirus ELISA test in neonates. *J Pediatr* 103: 259-62
- KUTSUZAWA T, KONNO T, SUZUKI H, EBINA T, ISHIDA N (1982) Two distinct electrophoretic migration patterns of RNA segments of human RV prevalent in Japan in relation to their serotypes. *Microbiol Immunol* 26: 271-273
- LANCET-Editorial (1979) Rotavirus syndrome. *Lancet* 2: 186
- LIGHT JS, HODES HL (1943) Studies on epidemic diarrhea of the newborn; isolation of a filtrable agent causing diarrhea in calves. *Am J Public Health* 33: 1451-54
- LIGHT JS, HODES HL (1949) Isolation from cases of infantile diarrhea of a filtrable agent causing diarrhea in infants. *J Exp Med* 90: 113-35
- LOCKER J (1979) Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea. *Analytic Biochem* 98: 358-67

- LOURENCO MH, MICOLAS JC, COHEN J, SCHERRER R, BRICOUT F (1981) Study of human RV genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann Virol Inst Pasteur* 132E: 161-73
- MARIATIS, FRITSCH, SAMBROOK J (1982) *Molecular Cloning*. Chapter 6: Extraction, purification, and analysis of mRNA from eukaryotic cells. Cold Spring Harbour Laboratory 1982
- MATA K, SIMHON A, URRUTIA JJ, KRONMAL RA, FERNANDEZ R, GARCIA B (1983) Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan indian children observed from birth to the age of 3 years. *J Infect Dis* 148: 452-61
- MATSUNO S, HASEGAWA A, KALICA AR, KONO R (1980) Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J Gen Virol* 48: 253-56
- MATSUNO S, UTAGAWA E, SUGIURA A (1983) Association of rotavirus infection with Kawasaki syndrome. *J Infect Dis* 148: 177
- MATTHEWS REF (1979) The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The Hague, Sept. 1978. *Intervirology* 11: 133-35
- MAXAM AM, GILBERT W (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560-64
- McCRAE MA (1981) Terminal structure of reovirus RNAs. *J Gen Virol* 55: 393-403
- McCRAE MA, FAULKNER-VALLE GP (1981) Molecular biology of RV. I. Characterization of basic growth parameters and pattern of macromolecular synthesis. *J Virol* 39: 490-99
- McLEAN BS, HOLMES IH (1981) Effects of antibodies, trypsin, and trypsin inhibitors on susceptibility of neonates to RV infection. *J Clin Microbiol* 13: 22-29
- McNULTY MS (1978) Review article-Rotaviruses. *J Gen Virol* 40: 1-18
- MEBUS CA, UNDERDAHL NR, RHODES MB, TWIEHANS MJ (1969) Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Bull Neb Agric Exp Station* 233: 1-16
- MERRIL CR, DUNAU M, GOLDMAN D (1981) A rapid sensitive stain for polypeptides in PAA gels. *Analyt Biochem* 110: 201-207

- MERRIL CR, GOLDMAN D, Van KEUREN ML (1982) Simplified silver protein detection and image enhancement methods in PAA gels. *Electrophoresis* 3: 17-23
- MERSON MH, SACK RB, ISLAM S, SAKLAYEN G, HUDA N, HUQ I, ZULICH AW, YOLKEN RH, KAPIKIAN AZ (1980) Disease due to enterotoxigenic E.coli in Bangladeshi adults: clinical aspects and a controlled trial of tetracycline. *J Infect Dis* 141: 702-10
- MIDDLETON PJ, SZYMANSKI MT, ABBOTT GD, BARTOLUSSI R, HAMILTON JR (1974) Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet* 1: 1241-44
- MIDDLETON PJ (1978) Pathogenesis of rotaviral infection. *J Am Vet Assoc* 173: 544-46
- MITSUNUBO I, RICHARDSON MA, IKEGAMI N, SHATKIN AJ, FURUICHI Y (1983) Molecular cloning of dsRNA virus genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 373-77
- MONTO AS, KOOPMAN JS, LONGINI IM, ISAACSON RE (1983) The Tecumseh study. XII. enteric agents in the community, 1976-1981. *J Infect Dis* 148: 284-87
- MORIMOTO R, LOCKER J, RABINOWITZ M (1978) *Fed Proc* 37: 1231
- MORRINET F, FERCHAL F, COLIMON R, PEROL Y (1984) Comparison of six methods for detecting HRV in stools. *Eur J Clin Microbiol* 3: 136-140
- NAGUIB, WYATT RG et al. (1984) Cultivation and subgroup determination of HRV from Egyptian infants and young children. *J Clin Microbiol* 19: 210-12
- NEN: Technical Report 5 (1982) Labelling Nucleic acid termini.
- NICOLAS JC, COHEN J, FORTIER B, LOURENCO MH, BRICOUT F (1983) Isolation of a human pararotavirus. *Virology* 124: 181-84
- NICOLAS JC, POTHIER P, COHEN J, LOURENCO MH, THOMPSON R, GUIMBAUD P, CHENON A, DAUVERGNE M, BRICOUT F (1984) Survey of HRV propagation as studied by electrophoresis of genomic RNA. *J Infect Dis* 149: 688-93
- OKADA Y, RICHARDSON MA, IKEGAMI N, NOMOTO A, FURUICHI Y (1984) Nucleotide sequence of HRV genome segment 10, an RNA encoding a glycosylated virus protein. *J Virol* 51: 856-59

- PALMER EL, MARTIN ML, MURPHY FA (1977) Morphology and stability of infantile gastroenteritis-virus: comparison with reovirus and bluetongue virus. *J Gen Virol* 35: 403-14
- PAUL MO, ENRINLE EA (1982) Influence of humidity of rotavirus prevalence among Nigerian infants and young children with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 15: 212-15
- PEACOCK AC, DINGMAN CW (1967) Resolution of multiple ribonucleic acid species by PAA gel electrophoresis. *Biochem* 6: 1818-27
- PEACOCK AC, DINGMAN CW (1968) Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochem* 7: 668-74
- PEDLEY S, BRIDGER JC, BROWN JF, McCRAE MA (1983) Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J Gen Virol* 64: 2093-2101
- POPPER KR (1984) Auf der Suche nach einer besseren Welt. Piper, München
- RICHARDSON MA, IWAMOTO A, IKEGAMI N, NOMOTO A, FURUICHI Y (1984) Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific antigen of human (Wa) rotavirus: comparison with the homologous genes from simian SA 11 and UK bovine rotaviruses. *J Virol* 51: 860-62
- RIEPENHOFF-TALTY M, BOGGER-GOREN S, LI P, CHARMODY PJ, BARRETT HJ, OGRA PL (1981) Development of serum and intestinal antibody response to rotavirus after naturally acquired rotavirus infection in man. *J Med Virol* 8: 215-22
- RODGER SM, SCHNAGL RD, HOLMES IH (1975) Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. *J Virol* 16: 1229-35
- RODGER SM, SCHNAGL RD, HOLMES IH (1977) Further biochemical characterization, including the detection of surface glycoproteins of human, calf, and simian rotaviruses. *J Virol* 24: 91-98
- RODGER SM, HOLMES IH (1979) Comparison of the genomes of simian, bovine, and human RV by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J Virol* 30: 839-46

- RODGER SM, BISHOP RF, BIRCH C, McLEAN B, HOLMES IH (1981) Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J Clin Microbiol* 13: 272-78
- RODGER SM, BISHOP RF, HOLMES IH (1982) Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in infant. *J Clin Microbiol* 16: 724-26
- RODRIGUEZ WJ, KIM HW, BRANDT CD, YOLKEN RH, ARROBIO JO, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM, PARROTT RH (1978) Sequential enteric illnesses associated with different RV serotypes. *Lancet* 2: 37
- RODRIGUEZ WJ, KIM HW, BRANDT CD, BISE B, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM, CURLIN G, PARROTT RH (1980) RV gastroenteritis in the Washington DC area. *Am J Dis Child* 134: 777-79
- RODRIGUEZ WJ, KIM HW, BRANDT CD, GARDNER MK, PARROTT RH (1983) Use of electrophoresis of RNA from HRV to establish the identity of strains involved in outbreaks in a tertiary care nursery. *J Infect Dis*: 34-40
- RUBENSTEIN AS, MILLER MF (1985) Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting RV. *J Clin Microbiol* 15: 938-944
- RYDER RW, OQUIST CA, GREENBERG HB, TAYLOR DN, ØRSKOV F, ØRSKOV J, KAPIKIAN AZ, SACK RB (1981) Travellers' diarrhea in Panamanian tourists in Mexico. *J Infect Dis* 144: 442-48
- RYDER RW, SINGH N, REEVES WC, KAPIKIAN AZ, GREENBERG HB, SACK RB (1985) Evidence of immunity induced by naturally acquired RV and Norwalk virus infection on two remote Panamanian islands. *J Infect Dis* 151: 99-105
- SAITO Y, MATSUNO S, MUKOYAMA A (1981) Exanthema subitum and rotavirus. *NEJM* 304:845
- SALMI TT, ARSTILA P, KOIVIKKO A (1978) Central nervous system involvement in patients with acute gastroenteritis. *Scand J Infect Dis* 10: 29-31
- SAMMONS DV, ADAMS LD, NISHIZAWA EE (1981) Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in PAA gels. *Electrophoresis* 2: 135-141

- SAULSBURY F, WINKELSTEIN J, YOLKEN RH (1980) Chronic RV infection in children with immunodeficiency diseases. *J Pediatr* 91: 61-65
- SIMMON A, CHRYSTIE IL, TOTTERDELL BM, BANATVALA JE, RICE SJ, WALKER-SMITH JA (1981) Sequential RV infection caused by virus of same subgroup. *Lancet* 1981: 1174
- SMITH ML, LAZDINS I, HOLMES IH (1980) Coding assignments of dsRNA segments of SA 11 rotavirus established by in vitro translation. *J Virol* 33: 976-82
- SNODGRASS DR, HERRING AJ, CAMPBELL I, INGLIS JM, HARGEAVES FD (1984) Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs, and man. *J Gen Virol* 65: 909-14
- SOENARTO Y, SEBODO T, RIDHO R, ALRASJIH H, RHODE JE, BUGG HC, BARNES GL, BISHOP RF (1981) Acute diarrhea and RV infection in newborn babies and children in Yogyakarta, Indonesia, from June 1978 to June 1979. *J Clin Microbiol* 14: 123-29
- SPENCE E, ARIAS M (1981) In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J Virol* 40: 1-10
- SPENCER EG, AVENDANO LF, GARCIA BI (1983) Analysis of HRV mixed electropherotypes. *Infect Immun* 39: 569-74
- STEEL RB, TORRES-MEDINA A (1984) Effects of environmental and dietary factors on HRV infection in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 43: 906-911
- STREET JE, CROXSON MC, CHADDERTON WF, BELLAMY AR (1982) Sequence diversity of HRV strains investigated by northern blot hybridization analysis. *J Virol* 43: 369-78
- SUGINO A, SNOPEK TJ, COZZARELLI NR (1977) Bacteriophage T₄ RNA ligase. *J Biologic Chem* 252: 1732-38
- TAO H, GUANGMU C, CHANGAN W (1983) Rotavirus-like agent in adult nonbacterial diarrhoea in China. *Lancet* 2: 1078
- TAO H, CHANGAN W, ZHAOYING F, ZINYI C, YUEJIAN C, XIAOQUANG C (1984) Waterborne outbreak of RV diarrhoea in adults in China caused by a novel RV. *Lancet* May 1984: 1139-1142
- TAYLOR JM (1979) The isolation of eukaryotic mRNA. *Ann Rev Biochem* 48: 681-717

- THEIL KW, McCLOSKEY CA, SAIF LJ, REDMAN DR, BOHN EH, HANCOCK DD, KOHLER EM, MOORHEAD PD (1981) Rapid, simple method of preparing rotaviral dsRNA for analysis by PAA gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 14: 273-280
- THOMSON AH, DEARLOVE J, LEWIS I, LATHAM P, BIRKIN N, KEOGH A (1981) Outbreak of RV gastroenteritis among premature infants. *Br Med J* 283: 1405
- TODD D, McNULTY MS (1976) Characterization of pig RV RNA. *J Gen Virol* 33: 147-50
- TOTTERDELL BM, NICKOLSON KG, MacLEOD J, CHRYSTIE IL, BANATVALA JE (1982) Neonatal RV infection: role of lacteal neutralizing α_1 -anti-trypsin and nonimmunoglobulin antiviral activity in protection. *J Med Virol* 10: 37-44
- VESIKARI T, ISOLAURI E, DELEM A, D'HONDT E, ANDRÉ FE, ZISSIS G (1983) Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine RV vaccine strain rit 4237 in adults and young children. *Lancet* 2: 807-11
- WALTHER FJ, BRUGGEMAN C, DANIELS-BOSMAN MSM, POURIER S, GRAULS G, STALS F, BOGAARD AVD (1983) Symptomatic and asymptomatic RV infections in hospitalized children. *Acta Pediatr Scand* 72: 659-63
- WENMAN WM, HINDE D, FELTHAM S, GURWITH M (1979) RV infections in adults-results of a prospective family study. *NEJM* 301: 303-6
- WHITE L, PEREZ I, PEREZ M, URBINA G, GREENBERG HB, KAPIKIAN AZ, FLORES J (1984) Relative frequency of RV subgroups 1 and 2 in Venezuelan children with gastroenteritis as assayed with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1984: 516-520
- WYATT RG, JAMES HD, PITTMAN AL, HOSHINO Y, GREENBERG HB, KALICA AR, FLORES J, KAPIKIAN AZ (1983) Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J Clin Microbiol* 18: 310-17
- YOLKEN RH, WYATT RG, ZISSIS G, BRANDT CD, RODRIGUEZ WJ, KIM HW, PARROTT RH, URRUTIA JJ, MATA L, GREENBERG HB, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM (1978) Epidemiology of HRV types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *NEJM* 299: 1156-61

- YOLKEN RH, BISHOP CA, TOWNSEND JR, BOLYARD EA, BARTLETT J, SANTOS GW, SARAL R (1982) Infectious gastroenteritis in bone-marrow-transplant recipients. NEJM 306: 1009-12
- YOLKEN RH (1983) Use of monoclonal antibodies for viral diagnosis. In: New developments in diagnostic virology. Ed: BACHMANN PA. Springer, Heidelberg 1983, p 177-196
- YOLKEN RH (1984) Rotaviruses and other viruses causing gastroenteritis. In: Textbook of human virology. Ed: BELSHE RB. PSG. Littleton 1984, p 795-809
- YOLKEN RH, LOSONSKY GA, VONDERFECHT S, LEISTER F, WEE S-B (1985) Antibody to HRV in cow's milk. NEJM 312: 605-610
- ZISSIS G, LAMBERT JP (1980) ELISAs adapted for serotyping of HRV. Lancet 1: 38-39

VIII. Lebenslauf

Am 15.1.1960 in Fulda geboren. Dort Besuch der Volksschule von 1967 bis 1971, danach des Freiherr-vom-Stein-Gymnasiums bis Januar 1979.

Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes im Herbst 1978 durch das Abiturientenauswahlverfahren.

Beginn des Medizinstudiums im Sommersemester 1979 an der Johann-Gutenberg-Universität in Mainz. Dort Ärztliche Vorprüfung am 24.3.1981.

Fortsetzung des Studiums zum Wintersemester 1981/82 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Erster Teil des Staatsexamens am 25.3.1982 in München.

Vom September 1983 bis Juni 1984 Auslandsstudium am Middlesex-Hospital in London.

Zweiter Teil des Staatsexamens am 26.8.1984 in München. Im September 1984 Wechsel zur Fortsetzung des Studiums im Praktischen Jahr an die Universität zu Köln.

Dort Beendigung des Studiums mit dem Praktischen Jahr am Städtischen Klinikum Köln-Merheim vom Oktober 1984 bis September 1985.

Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung am 30.10.1985 in Köln.

Im Sommer 1982 Beginn der Bearbeitung des vorliegenden Themas. Die experimentellen Arbeiten werden im August 1983 beendet.

